

Національна академія наук України
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Горак Ірина Романівна

УДК 577.112+576.32/36+616-006.6

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЛЬ АДАПТЕРНОГО ПРОТЕЇНУ RUK/CIN85 У КОНТРОЛІ
МІГРАЦІЇ Й ІНВАЗІЇ ПУХЛИННИХ КЛІТИН *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

03.00.04 – біохімія
Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Горак І. Р.

Науковий керівник: **Дробот Людмила Борисівна**, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Горак І. Р. Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Рак грудної залози лідирує серед інших онкологічних захворювань за рівнем смертності внаслідок метастазування і набуття пухлинними клітинами резистентності до терапії. В основі посиленої інвазивності та метастазування карциномних клітин лежить епітелійно-мезенхімний перехід (EMT) – програма трансдиференціювання клітин епітелійного походження, внаслідок якої пухлинні клітини втрачають епітелійні ознаки, такі як апікально-базальна полярність і міжклітинні контакти, і набувають мезенхімних ознак, таких як витягнута фібробластоподібна форма клітини, посилена рухливість, активація металопротеїназ тощо. У відповідь на рецептор-опосередковану індукцію EMT, у пухлинній клітині активуються транскрипційні фактори SNAI1, Twist і Zeb1/2, які індують експресію мезенхімних маркерів, і репресують експресію епітелійних маркерів. У зв'язку з цим, постає потреба пошуку молекулярних мішеней для впливу на розвиток EMT та боротьбу з пухлинними клітинами, що мають високоінвазивний мезенхімний фенотип. Серед потенційних мішеней для дії таргетної терапії, скерованої на EMT, виділяють різноманітні компоненти сигналювання клітини – мембранні рецептори, ефекторні кінази, транскрипційні фактори, а також адаптерні протеїни.

Адаптери – це протеїни модульної будови, які забезпечують збирання сигнальних комплексів, регулюють, скеровують та полегшують внутрішньоклітинне сигналювання. До таких молекул належить і адаптерний протеїн Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa). Це представник родини CIN85/CMS, що складається з трьох SH3

доменів (А, В і С) на N-кінці молекули, збагаченого на пролін району та надспіралізованого домену на С-кінці молекули. На сьогодні описано близько 300 протеїнів-партнерів Ruk/CIN85, шляхом взаємодії з якими цей адаптерний протеїн бере участь у таких процесах як ендоцитоз активованих рецепторних тирозинкіназ, організація і біогенез елементів цитоскелету, адгезія, інвазивність, апоптоз тощо.

Було показано, що первинні пухлини грудної залози людини характеризуються зростанням експресії Ruk/CIN85, особливо в зонах інвазії та метастазування, а високий рівень експресії Ruk/CIN85 корелює з пізніми стадіями розвитку пухлини і поганим прогнозом. Не зважаючи на зв'язок цього адаптерного протеїну з метастазуванням та малігнізацією пухлинних клітин, молекулярні механізми його залучення до цих процесів вивчені недостатньо.

Враховуючи сказане, метою даної дисертаційної роботи було дослідити механізми, залежні від адаптерного протеїну Ruk/CIN85, що забезпечують контроль процесів міграції й інвазії пухлинних клітин на моделях *in vitro* та *in vivo*. Відповідно до мети було поставлено 6 завдань: 1) Отримати сублінії аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією/зниженою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85. 2) Охарактеризувати EMT-асоційовані особливості поведінки клітин 4T1 (проліферативний потенціал, адгезивність, здатність до міграції й інвазії *in vitro*) залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 в отриманих сублініях. 3) Проаналізувати рівні експресії генів, залучених до контролю EMT в клітинах 4T1, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 методами кількісної RT-PCR, імунофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот аналізу. 4) Дослідити активності металопротеїназ і лізилоксидаз, продукування ангіостатинів та особливості організації актинового цитоскелету в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85. 5) Встановити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі розвитку ознак, властивих для ракових стовбурових клітин (експресію

маркерів CSCs, формування мамосфер, ріст у напіврідкому агарі, хіміорезистентність). 6) Оцінити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у метастазуванні *in vitro* та *in vivo* (трансендотеліальна міграція, проникність капілярів легенів до барвника Evans Blue, ефективність колонізації легенів, метастазування в легені на моделі експериментального метастазування).

Як модель для дослідження використовували сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією (сублінії RukUp-1, RukUp-2) і зниженою експресією (сублінія RukDown) адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Було виявлено залежність морфології клітин 4T1 від рівня експресії Ruk/CIN85: клітини з надекспресією Ruk/CIN85 мали переважно округлу та витягнуту еліпсоїдну форму, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 супроводжувались набуттям ще більш вираженого епітелійного фенотипу.

Методами прямого підрахунку клітин, МТТ-тестом та за кількістю Кі67-позитивних ядер у клітинах досліджуваних субліній було продемонстровано негативний зв'язок між проліферативним потенціалом і рівнем експресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1. Також виявили, що надекспресія Ruk/CIN85 веде до зниження адгезії клітин 4T1 до колагену 1 типу і фібронектину, але не Матригелю, а пригнічення експресії Ruk/CIN85 – до посилення адгезії до усіх досліджених матриксів. Рухливість клітин *in vitro* досліджували методом заростання подряпини, а інвазивність – за допомогою модифікованої камери Бойдена. Продемонстровано, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризувались достовірним зростанням їх рухливості та інвазивності через Матригель, фібронектин і колаген I типу, тоді як у клітинах сублінії RukDown ці властивості були пригнічені. Динаміку міграції та інвазії через Матригель *in vitro* оцінювали за допомогою приладу xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument і встановили, що вже через 12 год. після початку експерименту зростала ефективність як міграції, так і інвазії клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 у порівнянні з контролем. Було відібрано високоінвазивні субпопуляції

клітин 4T1 дикого типу і продемонстровано, що в цих субпопуляціях вміст Ruk/CIN85 був вищим. Одержані результати свідчать про те, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до контролю проліферації, адгезивності, рухливості та інвазії клітин раку грудної залози.

Аналізом рівнів експресії генів, асоційованих з EMT, методами кількісної ПЛР, Вестерн-блот аналізу та флуоресцентної конфокальної мікроскопії виявлено, що в клітинах з надекспресією Ruk/CIN85 зростали експресія мРНК та протеїну мезенхімного маркера віментину, і знижувались – епітелійного маркера E-кадгерину. Для клітин сублінії RukDown, навпаки, показано зростання експресії E-кадгерину і пригнічення експресії віментину. Ці дані було підтверджено за допомогою конфокальної флуоресцентної мікроскопії. Аналіз експресії транскрипційних факторів-регуляторів EMT, а саме Snail, Twist1, Zeb1 і Zeb2, показав, що при надекспресії Ruk/CIN85 достовірно зростали, а при пригніченні експресії Ruk/CIN85 – достовірно знижувались рівні експресії усіх чотирьох досліджуваних генів. Водночас, за рівнями експресії негативних регуляторів EMT, транскрипційних факторів KLF17 і Myb, виявлено негативну залежність між їх експресією і вмістом Ruk/CIN85 у клітинах 4T1. Аналіз експресії молекул адгезії (Tgfb1, Icam, Tjr, Itgb1, Fn1, Cfl1) показав, що рівні їх експресії знижувались у сублінії RukUp-1 і зростали у сублінії RukDown, що узгоджується з попередніми даними про пригнічення адгезивності клітин 4T1 за умов надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. За результатами аналізу рівнів експресії молекул запалення, було виявлено, що Ruk/CIN85 посилював експресію ліпокаліну-2, інтерлейкіну-1, -6, та Cxcl5. Ефективні інвазія пухлинних клітин за мезенхімним типом потребує експресії й активації протеїназ, які розщеплюють компоненти позаклітинного матриксу. Неочікувано, було встановлено, що у високоінвазивній сублінії RukUp-1 рівні експресії MMP-2, MMP-9 та катепсину D пригнічувались, тоді як у низькоінвазивній сублінії RukDown - зростали. Було також виявлено, що Ruk/CIN85 позитивно регулював експресію урокінази та її інгібітора, і негативно – рецептора

урокинази. Отже, в даній роботі вперше було продемонстровано здатність Ruk/CIN85 модулювати експресію генів, асоційованих з EMT/MET, залежно від рівня його експресії в пухлинних клітинах.

Використання методу желатинової зимографії для аналізу активності матричних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 дозволило показати, що активність цих ензимів зростала в клітинах RukDown і знижувалась в клітинах RukUp-1. Після забарвлення актинового цитоскелету за допомогою TRITC-фалоїдину, у клітинах RukUp-1 було виявлено кортикальне актинове кільце і специфічні вип'ячування мембрани («блеби»), характерні для клітин, які мігрують за амебоїдним типом. До того ж, у клітинах RukUp-1 достовірно зростали рівні експресії генів лізилоксидаз Lox і Lox12 та активність цього ензиму, тоді як в сублінії RukDown як експресія, так і активність лізилоксидази була пригніченою. Металопротеїнази можуть брати участь у обмеженому протеолізі плазміногену з утворенням кригнл-вмісних фрагментів - ангіостатинів, які пригнічують ангіогенез, рухливість та інвазивність пухлинних клітин. За допомогою Вестерн-блот аналізу було виявлено фрагмент з молекулярною масою 50 кДа у лізатах клітин досліджуваних субліній, причому найбільшу кількість ангіостатинів продукували клітини сублінії RukDown, а в сублінії RukUp-1 вони майже не виявлялись. Застосування ангіостатинів, що містять 1-3 та 5 крингли, призводило до пригнічення інвазивності високоінвазивних клітин RukUp-1 приблизно удвічі. Застосування інгібітора металопротеїназ GM6001 відновлювало інвазивність клітин, а інгібітор серинових протеїназ мав інгібувальний ефект на інвазивність. Одержані результати свідчать про те, що надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 супроводжується набуттям ознак, характерних для амебоїдного типу міграції.

Ступінь прояву ознак ракових стовбурових клітин (CSCs) у клітинах лінії 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 оцінювали за експресією специфічних поверхневих маркерів CD44 і CD24 та генів репрограмування, здатністю формувати сфероїди (мамосфери) при

культивуванні на низькоадгезивному пластику, резистентністю до дії доксорубіцину та активацією альдегіддегідрогенази ALDH. Було показано, що в клітинах RukUp-1 достовірно зростав рівень експресії CD44, і пригнічувалась експресія CD24. У клітинах сублінії RukDown виявлено протилежно спрямовані зміни у рівнях експресії CD44 і CD24 та пригнічення експресії Oct4. При дослідженні здатності клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 до сфероїдоутворення встановлено, що клітини RukUp-1 формували достовірно більшу кількість сфероїдів, причому ця здатність зберігалась протягом як мінімум 4 пасажів, а клітини RukDown, навпаки, формували меншу кількість сфероїдів. Окрім цього, сфероїди, утворені клітинами RukUp-1, мали неправильну форму і нерівні краї. Для оцінки впливу Ruk/CIN85 на хіміорезистентність клітин 4T1, визначали значення напівлетальної дози (IC_{50}) для доксорубіцину і показали, що цей показник достовірно зростав для клітин RukUp-1, і знижувався для клітин RukDown. Також, було виявлено позитивну кореляцію між рівнем експресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 і активністю ензиму детоксикації ALDH. Тест на клоногенність в напіврідкому агарі показав, що як за контрольних умов, так і за присутності доксорубіцину, клітини RukUp-1 утворювали достовірно більшу кількість колоній, які, подібно до сфероїдів, мали неправильну форму. Клітини RukDown, навпаки, утворюють меншу кількість колоній. Одержані результати продемонстрували, що надекспресія Ruk/CIN85 веде до посилення прояву ознак CSCs.

Екстравазування – це ключовий етап процесу метастазування, під час якого відбувається вихід пухлинних клітин з кровотоку і «хоумінг» в дистантний орган. Ефективність екстравазування *in vitro* оцінювали за допомогою трансендотеліальної міграції (TEM), тобто міграції пухлинних клітин через шар ендотеліоцитів легені у модифікованій камері Бойдена. Було показано, що ефективність TEM для клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 була у 15 разів вищою, тоді як для клітин з пригніченою

експресією Ruk/CIN85, навпаки, знижувалась у порівнянні з відповідним контролем. На моделі *in vivo* оцінювали проникність капілярів легені до барвника Evans Blue і здатність досліджуваних клітин колонізувати легені мишей лінії Balb/c. Було продемонстровано, що у групі RukUp-1 достовірно зростала як проникність капілярів легені, так і кількість колоній в легені, у порівнянні з контролем. Метастатичний потенціал досліджуваних субліній клітин 4T1 оцінювали за допомогою експериментального метастазування. Для цього клітини досліджуваних субліній вводили 8-тижневим самкам мишей лінії Balb/c внутрішньовенно і через 2 тижні оцінювали кількість поверхневих метастазів і морфологічні зміни у легені. Було встановлено, що у групі RukUp-1 достовірно зростала кількість поверхневих метастазів у легені, тоді як у групі RukDown метастази практично не виявлялись. Морфологічний аналіз легені показав, що у тварин групи RukUp-1 легенева тканина була практично повністю заміщена пухлинною тканиною, виявлялись ознаки інвазії в сусідні тканини і в судини, тоді як в групі RukDown легеня зберігала практично нормальну структуру, виявлялись лише поодинокі мікрометастази, що свідчить про здатність адаптерного протеїну Ruk/CIN85 стимулювати метастазування клітин лінії 4T1 за умов його up-регулювання. Оцінювання відсотку ядер, позитивних за антигеном проліферації Ki67, у легневих метастазах показало, що в групі RukUp-1 зростав відсоток Ki67-позитивних пухлинних клітин, тоді як в групі RukDown – знижувався. Ці дані свідчать про те, що Ruk/CIN85, ймовірно, індукує мезенхімно-епітеліний перехід у пухлинних клітинах, які метастазували в легеню.

Результати проведених експериментальних робіт засвідчили участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі епітелійно-мезенхімної пластичності на моделях *in vitro* та *in vivo*. Одержані в даній дисертаційній роботі результати дозволяють зробити висновок, що високий рівень експресії Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 призводить до розвитку високоагресивного, гібридного мезенхімно-амебоїдного фенотипу, тоді як пригнічення експресії

адаптерного протеїна – до фіксування клітин 4T1 у гомогенному епітелійному стані і блокування епітелійно-мезенхімної пластичності.

Ключові слова: Ruk/CIN85, епітелійно-мезенхімний перехід, пластичність, ракові стовбурові клітини, метастазування, інвазія, рак грудної залози.

SUMMARY

Horak I. R. Role of adaptor protein Ruk/CIN85 in the control of migration and invasion of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. - Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.04 "Biochemistry". - Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

Breast cancer is one of the leading cancers by mortality due to metastasis and tumor chemoresistance. Enhanced invasiveness and metastasis of carcinoma cells are dependent on the epithelial-mesenchymal transition (EMT), - a transdifferentiation program of epithelial cells, resulting in losing epithelial features such as apical-basal polarity and intercellular contacts by tumor cells and acquiring mesenchymal features such as elongated fibroblast-like cell shape, enhanced motility, activation of metalloproteinases etc. In response to the receptor-mediated EMT induction, the transcription factors SNAIL, Twist and Zeb1/2 activate the expression of mesenchymal markers and repress the expression of epithelial markers. According to the above mentioned, there is a need to search for molecular targets in order to influence the EMT development and the fight against tumor cells with highly invasive mesenchymal phenotype. Among the potential targets for targeting therapy directed at EMT, various components of cell signaling networks are distinguished: membrane receptors, effector kinases, transcription factors, and adaptor proteins.

Adaptors are proteins of a modular structure that provide assembly of signaling complexes, regulate, direct and facilitate intracellular signaling. This

group of molecules include adaptor protein Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa). Ruk/CIN85 is a member of CIN85/CMS family, consisting of three SH3 domains (A, B, and C) on the N-terminus, proline-enriched region, and coil-coiled domain on the C-terminus of the molecule. To date, about 300 Ruk/CIN85 protein partners have been described, through which this adaptor protein is involved in various cellular processes such as endocytosis of ligand-activated receptor tyrosine kinases, organization and biogenesis of cytoskeleton elements, adhesion, invasiveness, and apoptosis. It has been shown that human primary breast tumors are characterized by increased expression of Ruk/CIN85, especially in areas of invasion and metastasis. Moreover, high levels of Ruk/CIN85 expression correlate with tumor stage and poor prognosis. Despite the association of this adaptor protein with metastasis and malignancy of tumor cells, the molecular mechanisms of its involvement in these processes are not sufficiently studied. The aim of this thesis was to investigate the mechanisms dependent on the adaptor protein Ruk/CIN85, providing control of migration and invasion of tumor cells on *in vitro* and *in vivo* models. According to the aim, 6 tasks were set: 1) To obtain subclones of mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells with stable overexpression/knockdown of Ruk/CIN85. 2) To characterize EMT-associated features of 4T1 cells behavior (proliferative potential, adhesiveness, motility and invasion *in vitro*) depending on the expression levels of Ruk/CIN85. 3) To analyze the expression of genes involved in EMT control in 4T1 cells with different expression levels of adaptor protein Ruk/CIN85 by quantitative RT-PCR, immunofluorescence microscopy and Western blot analysis. 4) To investigate the activity of metalloproteinases and lysyl oxidase, angiostatin production, and the features of actin cytoskeleton organization in 4T1 cells with different levels of Ruk/CIN85 expression. 5) To study the role of adaptor protein Ruk/CIN85 in the control of cancer stem cells properties (expression of CSCs surface markers, anchorage-independent growth, chemoresistance). 6) To evaluate the role of Ruk/CIN85 in metastasis *in vitro*

and *in vivo* (transendothelial migration, lung vessels permeability to Evans Blue dye, lung seeding, lung metastasis on the experimental metastasis model).

As a model, we used sublines of murine breast adenocarcinoma 4T1 cells with stable overexpression (sublines RukUp-1, RukUp-2) and knockdown (subline RukDown) of adaptor protein Ruk/CIN85. The effect of Ruk/CIN85 expression level on 4T1 cell morphology was revealed: Ruk/CIN85-overexpressing cells acquired rounded and elongated shape, while Ruk/CIN85 down-regulation was accompanied by the acquisition of more pronounced epithelial phenotype. 4T1 sublines proliferative potential was estimated by direct cells counting, by MTT-assay, and by the percent of Ki67-positive nuclei. Negative correlation between the proliferative potential and Ruk/CIN85 expression level in 4T1 cells was demonstrated. It has also been found that Ruk/CIN85 overexpression led to a decrease in the adhesion of 4T1 cells to collagen type 1 and fibronectin, but not to Matrigel, while knockdown of Ruk/CIN85 resulted in increased adhesiveness to all three types of extracellular matrix. *In vitro* cell motility was estimated by scratch assay, and invasiveness – using a modified Boyden chamber. It was demonstrated that Ruk/CIN85-overexpressing 4T1 cells are characterized by a significant increase in their motility and invasiveness through Matrigel, fibronectin, and type I collagen, while in RukDown cells these properties were suppressed. Dynamics of *in vitro* cell motility and Matrigel invasiveness was evaluated using the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument. It was found that after 12 hours after the start of the experiment, the effectiveness of both motility and invasiveness of RukUp-1 cells were increased significantly in comparison to control. Highly invasive subpopulations of 4T1 wild-type cells were selected by Matrigel invasion and subsequent propagation, and it was demonstrated that these cells are characterized by increased Ruk/CIN85 content. The results obtained indicate that adaptor protein Ruk/CIN85 is involved in the control of proliferation, adhesion, motility, and invasiveness of breast cancer cells.

Expression of EMT-related genes in 4T1 cells with different levels of Ruk/CIN85 expression was analysed by quantitative RT-PCR, Western blotting,

and fluorescent confocal microscopy. Ruk/CIN85-overexpressing 4T1 cells revealed increased expression of mesenchymal marker vimentin and decreased expression of epithelial marker E-cadherin at mRNA and protein levels. In contrary, for Ruk/CIN85-downregulated 4T1 cells increased E-cadherin expression and decreased vimentin expression were shown. These data were confirmed by confocal fluorescent microscopy. The analysis of transcription factors – EMT master regulators (Snai1, Twist1, Zeb1, and Zeb2) expression in 4T1 cells with different Ruk/CIN85 content showed that expression levels of these transcription factors in RukUp-1 cells were significantly increased, and in RukDown cells – significantly decreased. In contrast, the expression levels of EMT negative regulators, transcription factors KLF17 and Myb, correlated negatively with Ruk/CIN85 expression in 4T1 sublines. Expression of adhesion molecules (Tgfb1, Icam, Tjp, Itgb1, Fn1, Cfl1) was attenuated in RukUp-1 cells, but elevated in Ruk/Down cells, which is consistent with the previous data on the negative regulation of adhesion by adaptor protein Ruk/CIN85. By evaluating expression levels of the inflammatory molecules, it was found that Ruk/CIN85 induces expression of lipocalin-2, interleukin-1, -6, and Cxcl5. Tumor invasion requires expression of proteinases that break down the components of extracellular matrix. However, it was found that expression of MMP-2, MMP-9 and cathepsin D in the highly invasive RukUp-1 subline was suppressed, while in weakly invasive subline RukDown, the expression of these genes increased. Also, Ruk/CIN85 regulates positively the expression of urokinase and its inhibitor, and the negatively - urokinase receptor. Thus, in this thesis for the first time was studied expression of EMT-related genes, depending on the Ruk/CIN85 expression level, and it was found that this adaptor protein modulates the expression of key molecules involved in EMT/MET.

The activity of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 was evaluated using gelatin zymography. It was shown that the activity of these enzymes increased in RukDown cells and decreased in RukUp-1 cells. By staining actin cytoskeleton with TRITC-conjugated phalloidin, a cortical actin ring and

membrane blebs, which are characteristic of cells migrating by amoeboid type, were found in RukUp-1 cells. In addition, in RukUp-1 cells, Lox and Loxl2 expression levels and enzymatic activity of lysyl oxidase were significantly increased, while in RukDown subline, both expression and activity of lysyl oxidase were suppressed. Matrix metalloproteinases may be involved in the partial plasminogen proteolysis to form kringle-containing fragments - angiostatins, which inhibit angiogenesis, motility, and invasiveness of tumor cells. Western-blot analysis revealed plasminogen fragment with molecular weight of 50 kDa in cell lysates. The highest quantity of angiostatin was produced by RukDown cells, while in RukUp-1 cells lysate almost no angiostatin production was detected. It was also shown that angiostatins containing 1-3 and 5 kringles inhibited invasiveness of highly-invasive RukUp-1 cells by two times. Application of the inhibitor of metalloproteinases GM6001 restored invasiveness of RukDown cells, while serine proteinase inhibitor pNFGB had an inhibitory effect on RukDown cells invasiveness. The obtained results indicate that Ruk/CIN85 overexpression in 4T1 cells is accompanied by the acquisition of amoeboid migration properties.

CSCs features in 4T1 cells with different expression levels of Ruk/CIN85 were evaluated by expression of specific surface markers CD44 and CD24 and reprogramming-related transcription factors, the ability to form spheroids (mammospheres) on low-adhesion plastic, doxorubicin resistance, and activity of aldehyde dehydrogenase. It was shown that in RukUp-1 cells CD44 expression level was significantly increased, and CD24 expression was suppressed. In RukDown cells oppositely directed changes in CD44 and CD24 expression levels were detected. As well, RukUp-1 cells were characterized by increased expression of Klf4 and Nanog, while in RukDown cells expression of Oct4 was suppressed. In the study of Ruk/CIN85 effect on 4T1 cells spheroid formation, it was found that RukUp-1 cells formed significantly higher number of spheroids, and this ability was maintained for at least 4 passages, while RukDown cells, on the contrary, formed less spheroids. In addition, spheroids formed by RukUp-1 cells had irregular shape and rough borders. In order to investigate Ruk/CIN85 effect on 4T1

cells chemoresistance, the quantification of IC_{50} for doxorubicin was determined and it was demonstrated that IC_{50} was significantly increased for RukUp-1 cells and decreased for RukDown cells. Also, a positive correlation was found between Ruk/CIN85 expression level in 4T1 cells and ALDH enzymatic activity. Clonogenicity test in semi-solid agar demonstrated that both under control conditions and in the presence of doxorubicin, RukUp-1 cells formed a significantly higher number of colonies, which, likely to spheroids, had irregular shape. RukDown cells, by contrast, were characterized by attenuated clonogenicity. The data obtained demonstrate that Ruk/CIN85 overexpression in 4T1 cells led to an increase in the manifestation of CSCs properties.

Extravasation is a key stage in metastatic process, when tumor cells leave the bloodstream and invade into the distant organ. Extravasation effectiveness *in vitro* was evaluated using transendothelial migration (TEM) assay, i.e. cancer cells migration through a layer of endothelial cells in a modified Boyden chamber. The effectiveness of TEM for Ruk/CIN85-overexpressing 4T1 cells was demonstrated to increase 15-fold compared to control, and for Ruk/CIN85-downregulated cells it decreased. Extravasation *in vivo* was evaluated by lung vessels permeability to Evans Blue dye and by lung seeding. It was demonstrated that in the RukUp-1 group both the permeability of lung vessels and the number of tumor-derived colonies in the lungs increased significantly compared to control. Metastatic potential of 4T1 cells with different Ruk/CIN85 expression levels was examined by experimental metastasis. Briefly, cancer cells were injected intravenously into 8-week female Balb/c mice, and after 2 weeks the number of surface metastases and morphological changes in lungs were evaluated. It was found that number of lung surface metastases significantly increased in RukUp-1 group, while in RukDown group metastases were nearly unidentified. Morphological analysis demonstrated that in animals of RukUp-1 group lungs were almost completely replaced with tumor tissue, signs of invasion in adjacent tissues and vessels were detected, while in the RukDown group the lungs retained nearly normal structure and rare micrometastases were detected.

These findings indicate that adaptor protein Ruk/CIN85 regulates lung metastasis of 4T1 cells. Also, the percentage of proliferation antigen Ki67-positive nuclei in pulmonary metastases cells was increased significantly in the RukUp-1 group, while in the RukDown group this indicator was decreased. These data suggest that Ruk/CIN85 may induce mesenchymal-epithelial transition (MET) in tumor cells that metastasize to the lungs.

The results of the experimental study demonstrated the participation of adaptor protein Ruk/CIN85 in the control of epithelial-mesenchymal plasticity on *in vitro* and *in vivo* models. The results obtained in this thesis allow to conclude that high expression level of Ruk/CIN85 in 4T1 cells leads to the development of a highly aggressive, hybrid mesenchymal-amoeboid phenotype, whereas down-regulation of this adaptor protein - to the fixation of 4T1 cells in a homogeneous epithelial state and the blockage of the epithelial-mesenchymal plasticity.

Key words: Ruk/CIN85, epithelial-mesenchymal transition, plasticity, cancer stem cells, metastasis, invasion, breast cancer.

Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації:

1. I. Horak, L. Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates chemoresistance of 4T1 breast cancer cells. Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (3): 94-100. (SCOPUS)
2. I. R. Horak, G. V. Pasichnyk, D. S. Gerashchenko, L. Knopfova, L. Borsig, L. B. Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates manifestation of cancer stem cells (CSCs) features in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2018; 12: 101-109.
3. I. Horak, L. Drobot, L. Borsig, L. Knopfova. Overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells is followed by increased migration rate and invasion potential. Biopolymers and Cell. 2018; 34 (4): 284-291. (SCOPUS).
4. Заявка на корисну модель № u201806310. МПК (2018.01): C12Q 1/6886, C12N 5/10, C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/16. Застосування

стабільних субліній пухлинних клітин як моделі для тестування протипухлинних препаратів, скерованих на знищення ракових стовбурових клітин / Дробот Л.Б., Комісаренко С.В., Пасічник Г.В., Горак І.Р., Геращенко Д.С., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України – заявл. 06.06.2018 р.; Висновок про відповідність від 05.10.2018 р. № 25674/ЗУ/18.

5. A. V. Bazalii, I. R. Horak, G. V. Pasichnyk, S. V. Komisarenko, L. B. Drobot. Transcriptional regulation of NOX genes expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is modulated by adaptor protein Ruk/CIN85. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 119-125. (**SCOPUS**)

6. G.V. Pasichnyk, O. O. Povorozniuk, I.R. Horak, D. S. Gerashchenko, O.V. Ponomarenko, A.A. Samoilenko, N.V. Byts, L.B. Drobot. Overexpression of adaptor protein Ruk1/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2013; 12: 149-156.

Апробація матеріалів дисертації:

7. Горак І., Пасічник Г., Поворознюк О., Самойленко А., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується активацією сигнальних шляхів, залежних від РІЗ-кінази та транскрипційного фактора NF-κВ, у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії МСF-7. // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014», Київ, 29-30 травня 2014. – Київ, 2014. – С. 29.

8. Поворознюк О., Пасічник Г., Горак І., Биць Н., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії МСF-7 супроводжується посиленням прояву властивостей ракових стовбурових клітин // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014», Київ, 29-30 травня 2014. – Київ, 2014. – С. 36.

9. Pasichnyk G., Povorozniuk O., Horak I., Gerashchenko D., Samoilenko A., Drobot L. Overexpression of adaptor ptoein Ruk₁/CIN85 in MCF-

7 cells is accompanied by increased resistance to doxorubicin // International Symposium on Cell Biology jointly with 4-th Ukrainian Congress for Cell Biology, Uzhhorod, 17-20 September 2014. – Uzhhorod, 2014. – P. 73.

10. Pasichnyk G., Povorozniuk O., Horak I., Geraschenko G., Petukhov D., Samoylenko A., Byts N., McCubrey J., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 overexpression results in the development of stemness characteristics of MCF-7 breast adenocarcinoma cells // FEBS J. – 2014. – Vol. 281, Suppl. 1. – P. 432.

11. Horak I., Petukhov D., Pasichnyk G., Gerashchenko D., Shabas N., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Ruk/CIN85 overexpression in mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells is accompanied by altered migration and invasion // Materials of the Conference for Young Scientists 2015 – p. 161 (Kyiv, Ukraine, September 21-25, 2015).

12. Horak Iryna, Pasichnyk Ganna, Gerashchenko Denys, Petukhov Dmytro, Shabas Nadia, Knopfova Lucia, Borsig Lubor, Drobot Liudmyla. Adaptor protein Ruk/CIN85 overexpression leads to increased adhesion, migration and invasion of mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells // Materials of the International conference “Advances in cell biology and biotechnology” – 2015 – p. 81 (Lviv, Ukraine, October 11-13, 2015).

13. Horak I., Pasichnyk G., Gerashchenko D., Petukhov D., Shabas N., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Functional properties of mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells depend on adaptor protein Ruk/CIN85 expression level // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, №4. – P. Матеріали конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня, 2015).

14. Стародубцева А., Пасічник Г., Горак І., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 асоційована з підвищенням їх резистентності до доксорубіцину // XIII Міжнародна наукова конференція молодих вчених. Шевченківська весна: Біологія-2015, Київ, 1-3 квітня 2015. – Київ, 2015. – С. 88.

15. Horak I. R. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces EMT in mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells // Матеріали конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016» - с. 14 (Київ, Україна, 26-27 травня 2016).

16. Horak I., Shytikov D., Petukhov D., Pasichnyk G., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 promotes lung mttastasis of 4T1 murine breast adenocarcinoma cells // Materials of the International Scientific Conference “Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer” (Kyiv, Ukraine, June 13-15, 2016).

17. Horak I., Pasichnyk G., Shabas N., Gerashchenko D., Petukhov D., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects breast cancer cell motility and invasion in vitro // Materials of X Parnas Conference. Young Scientists Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” – p. 47 (Wroclaw, Poland, July 10-12 2016).

18. Horak Iryna, Knopfova Lucia, Borsig Lubor, Pasichnyk Ganna, Drobot Liudmyla. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces EMT, migration and invasiveness of mice breast adenocarcinoma 4T1 cells // *FEBS J.*, Vol. 283, Issue Supplement S1, P. 431. Special Issue: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life (Ephesus/Kuşadasi, Turkey, September 3-8, 2016).

19. I. R. Horak, G. V. Pasichnyk, D. S. Gerashchenko, L. Knopfova, L. Borsig, L. B. Drobot. Cellular plasticity as a driving force in cancer progression: the regulatory role of adaptor protein Ruk/CIN85. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90 (3): 102-103.

20. Iryna Horak, Dmytro Shytikov, Denys Geraschenko, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. The adaptor protein Ruk/CIN85 paradoxically enhances EMT of triple negative mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells // Materials of International VACTRAIN/ 3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, January 16-17, 2017.

21. Iryna Horak, Dmytro Shytikov, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces genomic reprogramming in breast cancer cells and thereby increases their malignancy // Joint Meeting of the

25-th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2-nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, June 6-9, 2017. - Ukr. Biochim. J. – 2017. – Vol. 89. – No 3. – P. 81.

22. Horak I., Shytikov D., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a critical switch of EMT/MET programs in 4T1 cells // Materials of FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, Figueira da Foz, Portugal, June 18-24, 2017, - P.68.

23. Iryna Horak, Ganna Pasichnyk, Dmytro Shytikov, Denys Geraschenko, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 increases breast cancer cells malignancy via promoting EMT// Materials of Minisimposium with international participation “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines”, Kyiv, Ukraine, May 11, 2017.

24. Iryna Horak, Ganna Pasichnyk, Denys Gerashchenko, Nadia Shabas, Dmytro Shytikov, Dmytro Petukhov, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates malignancy of breast cancer cells // Materials of 14-th Horizons in Molecular Biology, Goettingen, Germany, September 11-14, 2017, - P. 77.

25. Iryna Horak, Ganna Pasichnyk, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 enhances the features of CSCs in breast cancer cells // International Scientific Conference “Normal and Cancer Stem Cells: Discovery, Diagnosis and Therapy”, Kyiv, Ukraine, October 5-6, 2017. – Experimental Oncology – 2017, Vol. 39, P. 242.

26. Iryna Horak, Tetiana Skaterna, Denis Geraschenko, Artem Tykhomyrov, Olga Khudiakova, Liudmyla Drobot. Knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9 associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasive potential. Exp. Oncol. 2018; 40: 162.

27. Iryna Horak, Ganna Pasichnyk, Denys Gerashchenko, Dmytro Shytikov, Tetiana Skaterna, Olga Khudiakova, Lucia Knopfova, Lubor Borsig,

Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a key regulator of epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer cells. Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (Special Issue): 17.

28. I. Horak, T. Skaterna, O. Khudiakova, D. Gerashchenko, D. Shytikov, D. Petukhov, A. Tykhomyrov, L. Kapustianenko, T. Grynenko, L. Drobot. Knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85 in tumor cells results in inhibition of their invasiveness and metastatic potential mediated by angiostatin production. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.

29. М. Кириченко, I. Горак, Л. Дробот. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію ключових маркерів епітелійно-мезенхімного переходу у клітинах раку молочної залози миші лінії 4T1. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.

30. М. Кір'якулова, А. Живоложний, I. Горак, А. Самойленко, Л. Дробот. Ізолування та характеристика екзосом, що продукуються пухлинними клітинами з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.

ЗМІСТ

	Стор
Перелік умовних скорочень	24
Вступ	25
РОЗДІЛ I	34
Огляд літератури	34
1.1 Адаптерні протеїни та їх роль у сигналюванні клітини	34
1.1.1 Будова і різноманітність адаптерних протеїнів	34
1.1.2 Участь адаптерних протеїнів у канцерогенезі	36
1.2 Будова та функції адаптерного протеїну Ruk/CIN85	42
1.2.1 Будова та особливості експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85	42
1.2.2 Зв'язувальні партнери адаптерного протеїну Ruk/CIN85	45
1.2.3 Функції адаптерного протеїну Ruk/CIN85	46
1.2.4 Участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в канцерогенезі	49
1.3 Молекулярні механізми метастазування пухлинної клітини	51
1.3.1 Загальна характеристика процесу метастазування	51
1.3.2 Епітелійно-мезенхімний перехід (EMT)	54
1.3.3 Різні типи міграції пухлинних клітин	57
1.3.4 Епітелійно-мезенхімна пластичність (ЕМП)	62
1.3.5 Ракові стовбурові клітини (CSCs) та їх роль у метастазуванні	63
РОЗДІЛ II	66
Матеріали та методи досліджень	66
2.1 Обладнання та реагенти	66
2.2 Методи досліджень	67
2.2.1 Культивування еукаріотичних клітин	67
2.2.2 Одержання субліній клітин лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85	67
2.2.3 Отримання лізатів клітин	68
2.2.4 Електрофорез протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналіз	68
2.2.5 Ізолювання та оцінювання якості РНК	70

2.2.6 Зворотна транскрипція	71
2.2.7 Кількісна ПЛР	72
2.2.8 Дослідження проліферативної активності клітин 4T1	74
2.2.9 Дослідження адгезивності клітин лінії 4T1	74
2.2.10 Дослідження міграційних властивостей клітин за допомогою тесту на заростання подряпини <i>in vitro</i>	75
2.2.11 Оцінка інвазивності клітин <i>in vitro</i> з використанням модифікованої камери Бойдена	75
2.2.12 Отримання високоінвазивних субпопуляцій клітин 4T1	76
2.2.13 Вивчення динаміки міграції та інвазії клітин з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85	76
2.2.14 Оцінювання активності желатиназ MMP-2 і MMP-9 методом зимографії	77
2.2.15 Оцінювання активності лізилоксидази	78
2.2.16 Оцінювання вмісту і локалізації протеїнів у клітині за допомогою конфокальної мікроскопії	78
2.2.17 Тест на сфероїдоутворення	79
2.2.18 Дослідження резистентності клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85 до доксорубіцину	79
2.2.19 Оцінювання трансформувального потенціалу клітин лінії 4T1 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85	80
2.2.20 Визначення активності альдегіддегідрогенази	80
2.2.21 Організація експериментів <i>in vivo</i>	81
2.2.22 Оцінювання трансендотеліальної міграції клітин з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85	81
2.2.23 Оцінювання проникності капілярів легені <i>in vivo</i>	82
2.2.24 Оцінювання здатності до колонізації легені <i>in vivo</i>	82
2.2.25 Експериментальне метастазування	82
2.2.26 Морфологічний аналіз зразків легені	83
2.2.27 Імуногістохімічне оцінювання вмісту антигена проліферації Ki-67	83

у клітинах, що метастазували в легені	
2.2.28 Статистична обробка результатів	84
РОЗДІЛ III	85
Результати досліджень	85
3.1 Отримання субліній клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85	85
3.2 Характеристика асоційованих з ЕМП особливостей поведінки клітин 4T1 (проліферативний потенціал, адгезивність, здатність до міграції й інвазії <i>in vitro</i>) залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 в отриманих сублініях	87
3.3 Аналіз рівнів експресії генів, залучених до контролю ЕМП, в клітинах 4T1 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 методами кількісної RT-PCR, імунофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот аналізу	98
3.4 Дослідження біохімічних та молекулярних маркерів MAT/MET (активностей металопротеїназ і лізилоксидази, продукування ангіостатинів та особливостей організації актинового цитоскелету) в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85	109
3.5 Дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі розвитку ознак, притаманних раковим стовбуровим клітинам (експресії маркерів CSCs, формування мамосфер, росту в напіврідкому агарі, хіміорезистентності)	114
3.6 З'ясування ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у екстравазуванні та метастазуванні	123
Аналіз та узагальнення результатів	130
ВИСНОВКИ	136
Список використаних джерел	138
Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації	171

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- AMT – амебоїдно-мезенхімний перехід
- CIN85 – протеїн масою 85 кДа, що взаємодіє з Сb1
- CSCs - ракові стовбурові клітини
- ECL – посилена хемілюмінесценція
- ECM – позаклітинний матрикс
- EMT – епітелійно-мезенхімний перехід
- GTP - гуанозинтрифосфат
- HIF-1 α – індукований гіпоксією фактор 1-альфа
- LOX - лізилоксидаза
- MAT – мезенхімно-амебоїдний перехід
- MET – мезенхімно-епітелійний перехід
- ММР – матриксна металопротеїназа
- PI3K – фосфатидилінозитол-3-кіназа
- qPCR – кількісна полімеразна ланцюгова реакція
- RT-qPCR – зворотна транскрипція - кількісна полімеразна ланцюгова реакція;
- Ruk – регулятор універсальної кінази
- TGF β – трансформувальний фактор росту бета
- VEGF – фактор росту ендотелійних клітин судин
- WT – клітини дикого типу
- АЛДГ - альдегіддегідрогеназа
- ЕМП – епітелійно-мезенхімна пластичність
- ЗФР – забуферений фосфатний розчин
- КТ – кімнатна температура
- МТТ - 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід
- ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
- РТК – рецепторна тирозинкіназа
- ТЕМ – трансендотеліальна міграція
- ТФ – транскрипційний фактор

ВСТУП

Актуальність теми. Рак грудної залози характеризується найвищим показником смертності серед жінок у всьому світі через метастазування як основну причину невдачі лікування. На регуляторному рівні, розвиток агресивного фенотипу пухлин тісно взаємопов'язаний з перетворенням неінвазивних пухлинних клітин у стовбурово-подібні (Cancer Stem Cells, CSCs), зростанням терапевтичної стійкості та метастатичного потенціалу. Водночас, наявні терапевтичні стратегії раку грудної залози, що включають комбінацію підходів, таких як хірургічні, хіміотерапевтичні, радіотерапевтичні, «таргетну» терапію, значною мірою націлені на первинну пухлину, але є неефективними проти метастазів пухлини, викликаних CSCs. Досягнення останніх років у галузі молекулярної клітинної біології переконливо продемонстрували, що оборотний процес епітелійно-мезенхімного переходу (EMT), включаючи версію EMT, мезенхімно-амебоїдний перехід (MAT), є рушійною силою метастазування пухлинних клітин. Здатність пухлинних клітин епітелійного походження до взаємного перепрограмування/транс-диференціаціювання в ході EMT-MAT/AMT-MET, що не потребує додаткових генетичних змін, в даний час отримало загальну назву епітелійно-мезенхімної пластичності (EMPI) [1, 2]. Одними з основних ознак EMT є втрата E-кадгерину, який розглядається як маркер епітелійного диференціювання в дослідженнях EMT, та індукована експресія мезенхімного маркеру віментину. E-кадгерин належить до родини трансмембранних глікопротеїнів, відповідальних за кальцій-залежну міжклітинну адгезію, тоді як віментин є складовим компонентом проміжних філаментів. Низка плейотропних транскрипційних факторів, включаючи Snail, Twist, Slug і ZEB1/2, регулюють розвиток EMT у карциномних клітинах через пряме пригнічення експресії гену E-кадгерину, що було продемонстровано в інвазивних фронтах карцином [3]. Набуття мезенхімно-амебоїдного міграційного фенотипу є передумовою для успішного розповсюдження пухлинних клітин, часто пов'язаного зі зниженням

проліферації. Клітини, що екстравазували в органи мішені, встановлюють тканинно-специфічне мікрооточення, необхідне для запуску процесів проліферації й ангиогенезу та формування вторинних вогнищ пухлинного росту, метастазів. Для ефективного росту метастатичних локусів необхідне зворотне відновлення ЕМТ до епітелійного фенотипу (MET) [4].

Молекулярні стратегії, які оркеструють ЕМП, включають в себе залежні від контексту динамічні зміни складу позаклітинного середовища, наступне модулювання рецептор-залежних сигнальних мереж, які, у свою чергу, забезпечують точне регулювання епігенетичних подій, зміни у профілях експресії генів і мікроРНК, трансляційні і посттрансляційні модифікації, морфологію і поведінку клітин [5]. Відповідно, у контексті ЕМП, виділяють три основні стратегії інгібування прогресування раку і появи рецидивів: (1) агенти, скеровані на сигнальні компоненти ЕМП, епігенетичні модифікатори і «антагоміри»; (2) агенти, які можуть вибірково знищувати клітини з мезенхімним фенотипом і (3) агенти, які можуть інгібувати пластичність і/або призводити до MET.

Сказане визначає необхідність глибокого і всебічного з'ясування молекулярних механізмів, за допомогою яких пухлинні клітини набувають підвищеної здатності до міграції, інвазії й наступного метастазування, що має вирішальне значення для розробки нових підходів, здатних поліпшити результати лікування раку молочної залози.

Одними із основних компонентів сигнальних мереж клітин є адаптерні/риштувальні протеїни. Ці протеїни характеризуються наявністю численних протеїно-/ліпідозв'язувальних доменів і мотивів, центрів для індукованої посттрансляційної модифікації і відсутністю каталітичних доменів. У багатьох випадках адаптерні/риштувальні протеїни є необхідними для повної активації сигнальних шляхів. Вони визначають утворення і локалізацію сигнальних комплексів і можуть сприяти проходженню чи інгібувати передачу сигналу залежно від їх концентрації в певному компартменті, регулюючи, таким чином, специфічність, ефективність і

амплітуду сигналювання [6]. Окрім того, недавно була встановлена здатність деяких риштувальних протеїнів функціонувати як ультрачутливі перемикачі регуляторних механізмів, які визначають розвиток альтернативних фенотипів клітин [7]. Враховуючи важливу роль адаптерних протеїнів у проведенні клітинних сигналів, цілком імовірно, що їх дисфункція може бути залучена до канцерогенезу. Результати наших попередніх досліджень продемонстрували підвищення експресії SH3-вмісного адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85K) в аденокарциномах грудної залози, особливо в зонах інвазивного росту [8]. Встановлено, що стабільна надекспресія повнорозмірної форми Ruk/CIN85 у слабо інвазивних аденокарциномних клітинах грудної залози людини лінії MCF-7 призводить до їх малігнізації, потенційно асоційованої з ЕМП [8].

Однак, на сьогодні у літературі повністю відсутні дані стосовно вкладу адаптерних/риштувальних протеїнів, зокрема Ruk/CIN85, до контролю біологічних відповідей пухлинних клітин, асоційованих з ЕМП. Невідомі також молекулярні механізми, що забезпечують репрограмування пухлинних клітин за участі адаптерів. Проведення досліджень у цьому напрямку дозволить не тільки з'ясувати роль адаптерних протеїнів у контролі ЕМП та ідентифікувати нові мішені для терапевтичного втручання, але й отримати нові моделі ліній клітин, придатні для пошуку і розробки протипухлинних препаратів та моніторингу ефективності їх дії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана у відповідності з планами наукових досліджень відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. У роботі використані результати досліджень, отримані в рамках бюджетних тем "Механізми участі адаптерного/риштувального білка Ruk/CIN85 у регулюванні біологічних відповідей нормальних і трансформованих клітин" (№ держреєстрації 0110U002698, 2010-2014 рр.), «Сигнальні мережі, залежні від адаптерного протеїну Ruk/CIN85, у контролі проліферативного потенціалу, міграції й

метастазування пухлинних клітин» (№ держреєстрації 0112U002624, 2015-2019 рр.). Робота виконувалась також у рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій” за проектом «Клітини, ізольовані з постійних ліній пухлинних клітин у вигляді сфероїдів, що експресують деякі маркери стовбурових клітин,- як моделі для вивчення механізмів канцерогенезу та пошуку і розробки протипухлинних препаратів нового покоління» (№ держреєстрації 0110U005968, 2010-2014 рр.), в рамках спільного проекту «с-Myb and Ruk/CIN85 modulate the signaling in breast cancer thereby affecting metastasis», підтриманого Національною Науковою Фундацією Швейцарії (Проект SCOPES № IZ73Z0_152361, 2014-2017 рр.), та гранту ДФФД Ф83 для молодих вчених (№ держреєстрації 0118U005080, 2018 р.).

Мета і завдання дослідження. Метою дослідження було дослідити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*. Відповідно до мети були поставлені такі завдання:

1. Отримати сублінії аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією/зниженою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85.
2. Охарактеризувати ЕМТ-асоційовані особливості поведінки клітин 4T1 (проліферативний потенціал, адгезивність, здатність до міграції й інвазії *in vitro*) залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 в отриманих сублініях.
3. Проаналізувати рівні експресії генів, залучених до контролю ЕМТ в клітинах 4T1, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 методами кількісної RT-PCR, імуофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот аналізу.
4. Дослідити активності металопротеїназ і лізилоксидази, продукування ангіостатинів та особливості організації актинового цитоскелету в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85.

5. Встановити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі розвитку ознак, властивих раковим стовбуровим клітинам (експресію маркерів CSCs, формування мамосфер, ріст у напіврідкому агарі, хіміорезистентність).

6. Оцінити роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у метастазуванні *in vitro* та *in vivo* (трансендотеліальна міграція, проникність капілярів легені до барвника Evans Blue, ефективність колонізації легені, метастазування в легеню на моделі експериментального метастазування).

Об'єкт дослідження. Молекулярні механізми контролю міграції, інвазії й метастазування аденокарциномних клітин грудної залози.

Предмет дослідження. Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку фенотипових і молекулярних ознак епітелійно-мезенхімної пластичності.

Методи дослідження: біохімічні, методи роботи з культурами клітин, культивування сфероїдів, ріст клітин у напіврідкому агарі, МТТ тест, дослідження міграційного потенціалу з використанням «подряпини» у клітинному моношарі, тести на інвазивність та трансендотеліальну міграцію з використанням модифікованої камери Бойдена, електрофорез протеїнів у ПААГ та нуклеїнових кислот в агарозному гелі, Вестерн-блот аналіз, кількісна RT-PCR, мікроарейний аналіз, конфокальна імуофлуоресцентна мікроскопія, тест на проникність капілярів легені з фарбою Evans Blue, тест на ефективність колонізації легені, тваринні моделі для експериментального та спонтанного метастазування, морфологічний аналіз гістологічних зрізів.

Наукова новизна роботи. Вперше показано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 є одним із ключових регуляторів епітелійно-мезенхімної пластичності у аденокарциномних клітинах молочної залози, забезпечуючи зворотне динамічне модулювання фенотипових і молекулярних ознак, асоційованих з ЕМП, залежно від рівня його експресії. Зокрема, встановлено, що надекспресія Ruk/CIN85 у аденокарциномних клітинах молочної залози миші лінії 4T1 призводить до пригнічення їх проліферативної активності,

зниження адгезивності, посилення росту, незалежного від прикріплення до субстрату, підвищеної рухливості, інвазивності та хіміорезистентності, розвитку ознак CSCs та змін у EMT-залежній транскрипційній програмі *in vitro*, а також посилення екстравазування пухлинних клітин та росту метастазів *in vivo*. Водночас, down-регулювання Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 супроводжується втратою пластичності завдяки індукуванню диференціювання і формування стабільного епітеліального фенотипу. Отримані дані про здатність Ruk/CIN85 спричиняти системні ефекти на транскрипційному рівні є цілком новими. Вперше продемонстровано, що в клітинах 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 мають місце узгоджені зміни в рівні експресії низки генів, необхідних для формування змішаного мезенхімно-амебоїдного фенотипу. Встановлено найважливіші зміни, необхідні для підтримки амебоїдного типу інвазивності: зниження експресії (і активності) MMP-2, MMP-9 та катепсину D, TGF- β 2 і інтегрину β 1, а також підвищення рівня експресії й активності лізилоксидази, формування примембранного актинового кільця та вип'ячувань плазматичної мембрани («блебів»), що забезпечує, таким чином, потенціал для ефективної міграції й інвазії клітин за умов пригніченого навколоклітинного протеолізу й клітинної адгезії. Вперше показано, що підвищені рівні експресії й активності MMP-2 і MMP-9 в клітинах 4T1 зі зниженою експресією Ruk/CIN85 корелюють з підвищеним продукуванням ангіостатинів та пригніченим інвазивним потенціалом

Практичне значення одержаних результатів. Результати дисертаційної роботи розширюють сучасні уявлення про роль адаптерних протеїнів у канцерогенезі, зокрема ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку фенотипових і молекулярних ознак, асоційованих з епітелійно-мезенхімною пластичністю. Результати транскрипційного профілювання генів в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85 вказують на те, що даний адаптерний протеїн може слугувати прогностичним маркером пухлинного процесу і потенційною мішенню для розробки фармакологічних препаратів, скерованих на інгібування пластичності аденокарциномних

клітин. Створені клітинні технології (стабільні сублінії з надекспресією Ruk/CIN85), здатні забезпечити підтримання активності CSCs *in vitro* протягом тривалого часу, можна рекомендувати для впровадження у практику біотехнологічних компаній для оцінювання ефективності новітніх протипухлинних препаратів та широкомасштабного скринування малих молекул і бібліотек siRNA на предмет вибіркового знищення CSCs та гібридного мезенхімно-амебоїдного фенотипу. Разом, результати проведених досліджень дозволяють вважати адаптерний протеїн Ruk/CIN85 як залежний від концентрації важливий регулятор ЕМП при раку грудної залози, що відкриває нові можливості для терапевтичного втручання. Результати дисертаційної роботи рекомендуються для використання в загальному курсі «Молекулярна біологія клітини» та спецкурсі «Сигнальні механізми клітин» для студентів університетів зі спеціальностей «біохімія», «молекулярна біологія», «біотехнологія».

Особистий внесок здобувача. У процесі виконання дисертаційної роботи автором особисто вибрано та проаналізовано наукову літературу за темою наукового дослідження. Дисертантом, спільно з науковим керівником розроблено програму проведення досліджень, вибрано методи розв'язання поставлених завдань та самостійно, або в деяких випадках спільно з іншими працівниками, виконано представлені у роботі експерименти. Експериментальна частина дисертаційної роботи була виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводились спільно зі співробітниками відділів сигнальних механізмів клітини та хімії і біохімії ферментів Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, лабораторії морфології ендокринної системи Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України, Інституту фізіології Цюрихського університету (м. Цюрих, Швейцарія) та відділу експериментальної біології Університету Масарика (м. Брно, Чеська республіка). Дослідження метастатичного потенціалу *in vivo* клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 на моделі експериментального метастазування та ефективності

екстравазування за допомогою тестів на проникність капілярів легені до барвника Evans Blue і формування резистентних до 6-тіогуаніну колоній проведено спільно з к.б.н., н.с. Шитіковим Д. В. і к.б.н., н.с. Петуховим Д. М.; дослідження впливу надекспресії Ruk/CIN85 на динаміку міграції й інвазії клітин 4T1 з використанням приладу xCELLigence RTCA DP Instrument та дослідження ефективності трансендотеліальної міграції клітин 4T1 з надекспресією та пригніченою експресією Ruk/CIN85 - спільно з PhD Кнопфовой Л. (Університет Масарика, Брно, Чеська республіка); дослідження ролі Ruk/CIN85 у контролі здатності клітин 4T1 формувати сфероїди та визначення активності матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 методом желатинової зимографії - спільно з к.б.н., н.с. Пасічник Г.В.; одержання субліній клітин 4T1 зі стабільною надекспресією Ruk/CIN85 - спільно з пров. інж. Геращенком Д. С., к.б.н., н.с. Пасічник Г. В., к.б.н., н.с. Петуховим Д. М.; морфологічний аналіз впливу Ruk/CIN85 на метастазування клітин лінії 4T1 – спільно з д.б.н. Воскобойник Л. Г. (Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України); Вестерн-блот аналіз продукції ангіостатинів клітинами 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 – спільно з к.б.н., с.н.с. Тихомировим А. О. Результати вищезгаданих досліджень опубліковано у спільних публікаціях.

Апробація результатів досліджень. Основні положення дисертації були представлені на Конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології» у 2014-2018 рр. (Київ, Україна), 4 Українському Конгресі клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014 р.), 11 Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014 р.), 39 та 41 Конгресі FEBS (Париж, Франція, 2014 р., Кушадасі, Туреччина, 2016 р.), конференції для молодих вчених (Київ, Україна, 2015 р.), міжнародній конференції «Досягнення в клітинній біології та біотехнології» (Львів, Україна, 2015 р.), Міжнародній науковій конференції молодих вчених «Шевченківська весна» (Київ, Україна, 2015 р.), міжнародній науковій

конференції «Інтегровані клініко-патогенетичні підходи до діагностики та терапії раку» (Київ, Україна, 2016 р.), 10 та 11 Парнасівській конференціях (Вроцлав, Польща, 2016 р., Київ, Україна, 2018 р.), VASTRAIN/ 3 Шведсько-Українській конференції з онкологічних захворювань (Стокгольм, Швеція, 2017 р.), лекційному курсі FEBS по онкометаболізму (Фігуейра да Фоз, Португалія, 2017 р.), міні симпозиумі «Нові тенденції в дослідженні раку та протипухлинних вакцин» (Київ, Україна, 2017 р.), 14 конференції «Горизонти в молекулярній біології» (Геттінген, Німеччина, 2017 р.), міжнародній конференції "Нормальні та ракові стовбурові клітини: відкриття, діагностика та терапія" (Київ, Україна, 2017 р.), симпозиумі «Фундаментальні принципи біотерапії раку» (Київ, Україна, 2018 р.), конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією» (Київ, Україна, 2018 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 30 робіт, які включають 5 статей у фахових виданнях, патент на корисну модель та тези 24 доповідей на міжнародних та вітчизняних наукових конференціях, з'їздах, конгресах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація містить такі розділи: вступ, аналітичний огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати та обговорення досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновки, додатки та список використаних джерел. Дисертацію викладено на 176 сторінках машинописного тексту і проілюстровано 30 рисунками та 3 таблицями. Список використаної літератури охоплює 317 найменувань.

РОЗДІЛ I

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Адаптерні протеїни та їх роль у сигналюванні клітини

1.1.1 Будова і різноманітність адаптерних протеїнів

Адаптерні молекули – це протеїни модульної структури, які зазвичай не мають ензиматичної активності, але складаються з доменів, що беруть участь у протеїново-протеїнових чи протеїново-ліпідних взаємодіях, і, таким чином, забезпечують збирання, просторову орієнтацію сигнальних комплексів, а також динаміку, специфічність та спрямованість внутрішньоклітинного сигналювання [9, 10, 11]. Розрізняють декілька різновидів адаптерних протеїнів: власне адаптерні протеїни (англ. – adaptor protein), риштувальні протеїни, або «скаффолди» (англ. – scaffold protein), та заякорювальні чи «докінгові» протеїни (англ. – anchoring protein та docking protein), хоча часто неможливо виділити єдину функцію адаптера, тому ці терміни вживають як синоніми [12, 13].

У більш вузькому розумінні, риштувальні протеїни виконують функцію молекулярних організаторів сигнальних комплексів: вони не лише пов'язують фізично компоненти сигнального комплексу між собою, а й визначають силу і напрямок проходження сигналу [14]. Розрізняють наступні молекулярні механізми, що лежать в основі функціонування риштувальних протеїнів: зв'язування, орієнтація та алостеричне регулювання. У випадку простого зв'язування «скаффолд» збільшує ефективну концентрацію молекул-складових сигнального комплексу, тоді як за відсутності риштувального протеїну молекули вільно дифундують. Для риштувальних протеїнів характерним є ефект комбінаторного інгібування: максимальна ефективність сигналювання спостерігатиметься лише при оптимальному стехіометричному співвідношенні молекул скаффолда та його зв'язувальних партнерів; як зниження, так і зростання концентрації скаффолда буде негативно впливати на стабільність комплексу, а отже, і на ефективність сигналювання. Ефект орієнтації полягає в обмеженні конформаційної

свободи молекул, що посилює інтенсивність сигналювання. Аlostеричне регулювання полягає у зміні конформації протеїну-зв'язувального партнера скаффолда, що супроводжується його активацією/інактивацією. Деякі риштувальні протеїни мають псевдокіназні домени, взаємодія яких з ефекторними кіназами веде до їх активації. Так, наприклад, псевдокіназний домен риштувального протеїну каскаду MAP кіназ KSR димеризується з MAPKKK Raf, що веде до активації Raf і дозволяє йому фосфорилувати MAPKK MEK [15]. Також, конформаційні зміни, зумовлені взаємодією протеїнів-субстратів з риштувальним протеїном, можуть супроводжуватись експонуванням центрів модифікації (наприклад, фосфорилування/дефосфорилування), що полегшує взаємодію протеїну-субстрату з відповідною протеїнкіназою [16]. Класичним прикладом риштувального протеїну є Ste5, залучений до «мейтингового» сигналювання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Цей протеїн зв'язує усі три ланки каскаду MAP кіназ (Ste11–Ste7–Fus3), і, як наслідок, забезпечує коректну локалізацію сигнального комплексу, шляхом взаємодії з MAPK Fus3 аlostерично індукує зміну її конформації та здатність до активації та забезпечує негативний зворотний зв'язок, а також захищає комплекс від деградації [17, 18].

Докінгові протеїни – це допоміжні протеїни, залучені до сигналювання РТК, які мають мембрано-асоційований район, центри протеїново-протеїнових взаємодій та залишки тирозину як мішені для фосфорилування активованими РТК. Типовим прикладом докінгового протеїну є IRS-1, PH (Pleckstrin homology) та РТВ (Phosphotyrosine binding) домени якого забезпечують взаємодію з рецептором до інсуліну, а після активації рецептора і фосфорилування низки залишків тирозину в молекулі IRS-1, PH домен заякорює IRS-1 у мембрані шляхом зв'язування з фосфоінозотидами, що веде не лише до простої взаємодії, але й до активації PI3K [19]. На відміну від докінгових протеїнів, заякорювальні протеїни (англ. - anchoring proteins) здатні локалізувати сигнальні комплекси у будь-якому компартменті клітини. Наприклад, протеїни родини AKAP (A-kinase anchoring proteins)

взаємодіють з протеїнкіназою А (ПКА), що веде, по-перше, до активації її каталітичної субодиниці С, а також, шляхом взаємодії з різними протеїнами-партнерами, до специфічної і оборотної співлокалізації ПКА з йонними каналами, плазматичною, ядерною чи мітохондріальною мембранами, цитоскелетом тощо [20, 21].

Адаптерні протеїни – це зазвичай молекули з меншою молекулярною масою, які зв'язують між собою два послідовні компоненти сигнального шляху. Адаптери зазвичай мають в своєму складі два і більше доменів, які забезпечують протеїново-протеїнові взаємодії з молекулами-партнерами, або ж складаються з двох зв'язувальних районів, кожен з яких містить кілька таких доменів. Прикладом адаптерного протеїну є Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2), SH2 (Src homology 2) домен якого взаємодіє з активованим (і фосфорильованим за залишками тирозину) рецептором епідермального фактора росту (EGFR), а SH3 (Src homology 3) домени – зі збагаченими на пролін районами протеїну Sos (Son of sevenless), який є фактором обміну гуанінових нуклеотидів (GEF, guanine-nucleotide exchange factor) малої ГТФ-ази Ras [14, 22].

Узагальнена схема структури та функціональних особливостей адаптерних, рибозомальних та докінгових протеїнів наведена на рис. 1.1. В даній роботі буде вживатись термін «адаптерний протеїн» у найбільш широкому розумінні, для позначення мультидоменного протеїну, який зв'язує ланки сигнального каскаду – тобто має властивості власне адаптерного чи рибозомального протеїну.

1.1.2 Участь адаптерних протеїнів у канцерогенезі

Канцерогенез – це комплексний процес, який забезпечується патологічною активацією/пригніченням сигнальних мереж, відповідальних за проліферацію клітини, контроль клітинного циклу, апоптоз, рухливість, інвазивність тощо. Адаптерні протеїни, які функціонують як ланки цих сигнальних шляхів, можуть потенційно бути залученими до регулювання канцерогенезу, а також слугувати

мішенями для пригнічення проліферації чи метастазування пухлинних клітин. В даному розділі буде проаналізовано інформацію стосовно адаптерних протеїнів сигнальних мереж, залежних від рецепторів до факторів росту, інтегринів, нерецепторних тирозинкіназ, та їх ролі у контролі канцерогенезу.

На сьогодні відомо, що інтегрини відіграють значну роль у контролі проліферації, виживання, міграції, адгезії, ремоделювання ЕСМ, інвазії пухлинних клітин, тому антагоністи залежного від інтегринів сигналювання є перспективними протипухлинними агентами [23]. Інтегрини – це гетеродимерні мембранні рецептори, які забезпечують адгезію клітини до молекул позаклітинного матриксу (ЕСМ). Хоча інтегрини не мають власного кіназного домену, проте при контакті з молекулами ЕСМ вони рекрутують та активують цитоплазматичні кінази, такі як FAK, Src тощо, а також адаптерні протеїни (наприклад, p130CAS), які опосередковують залежне від інтегринів сигналювання.

Родина адаптерів Cas складається з чотирьох протеїнів, серед яких p130^{Cas}/BCAR1 (p130 Crk-associated substrate/breast cancer antiestrogen resistance 1), та NEDD9 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9, також відомий як NEF1 або Cas-L) охарактеризовані як медіатори онкогенного сигналювання. Протеїни родини Cas складаються з чотирьох консервативних доменів: (I) SH3 домену, який взаємодіє зі збагаченими на пролін послідовностями низки цитоплазматичних протеїнів, в тому числі тирозинкінази FAK, яка є ключовим компонентом комплексів фокальної адгезії, які визначають адгезивність, здатність до міграції та інвазії пухлинних клітин. Встановлено, що пригнічення активності FAK супроводжується втратою здатності пухлинних клітин до метастазування [24]; (II) субстратний домен, збагачений на залишки проліну і тирозину, які можуть бути фосфорильовані кіназою Src і слугувати центрами зв'язування з SH2 доменами інших протеїнів, таких як Crk, Nck, SHIP2; (III) збагачений на серин район; (IV) С-кінцевий висококонсервативний домен, що містить центри зв'язування Src кінази та ділянки, залучені до гомо- та гетеродимеризації [25].

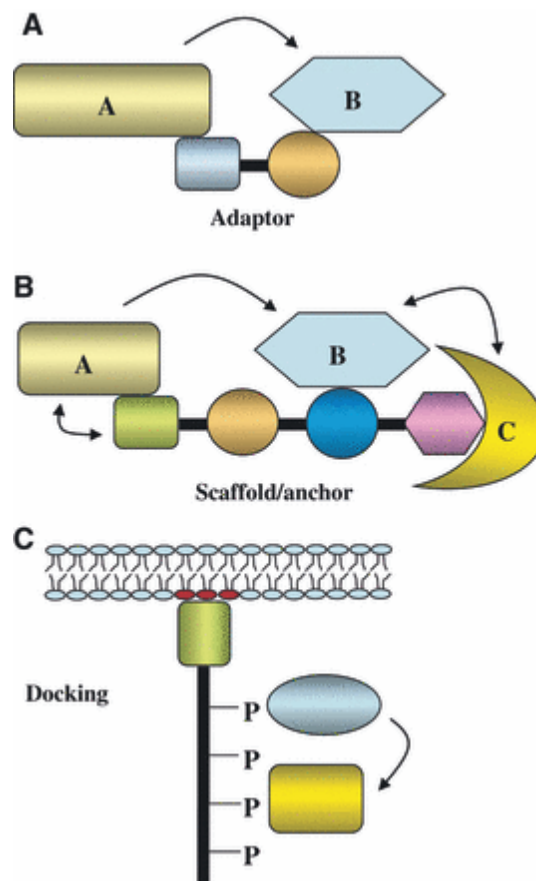


Рис. 1.1 Відмінності між адаптерними, риштувальними та докінговими протеїнами [14]. А – адаптерний протеїн, що складається з двох зв’язувальних модулів, та забезпечує зв’язок послідовних компонентів сигнального каскаду. Б – риштувальний протеїн, що має мультидоменну будову і забезпечує організацію та регулювання сигнального комплексу. С – докінговий протеїн, що обов’язково має мембрано-асоційований домен, забезпечуючи локалізацію сигнального комплексу поблизу мембрани

Відомо, що зв’язування Cas з протеїнкіназою Src стабілізує її в активній конформації, а надекспресія Cas веде до тривалої активації Src навіть за відсутності екзогенного сигналу [26, 27]. Src бере участь у стимуляції проліферації клітини, індукції факторів, залучених до метастазування, ангіогенезу та запалення, руйнуванні міжклітинних контактів та посиленні рухливості клітини, стабілізації адгезивних контактів [28], що свідчить про її проонкогенну функцію. Так, у 50% випадків раку товстого кишечника, печінки,

підшлункової залози, легені, грудної залози виявляють активацію сигналювання, залежного від Src [29]. З іншого боку, до фосфорильованого субстратного домену Cas можуть приєднуватись малі адаптери Crk та Nck, які в комплексі з Cas активують ГТФази родин Rho та Ras, а Rac1 і Rap1, які регулюють динаміку цитоскелету та залучені до контролю рухливості та проліферації нормальної і пухлинної клітини [30].

Накопичено значну кількість публікацій, які свідчать, що надекспресія протеїнів Cas, зокрема p130^{Cas} та NEDD9 [31] веде до малігнізації пухлинних клітин, зростання їх інвазивності, метастатичного потенціалу і навіть хіміорезистентності. Так, продемонстровано, що експресія NEDD9 у зразках раку шийки матки людини вища, ніж в нормальній тканині, до того ж, рівень експресії корелює зі стадією та кількістю метастазів. Надекспресія NEDD9 на моделі *in vitro* супроводжується зростанням рухливості та інвазивності пухлинних клітин та появою маркерів епітелійно-мезенхімного переходу (EMT), тоді як пригнічення експресії цього адаптера веде до протилежних результатів [32]. Схожі результати було отримано й іншими дослідниками. Так, у зразках аденокарциноми легені зростає експресія NEDD9 у порівнянні з нормальними зразками [33], а також спостерігається кореляція між вмістом NEDD9 та маркерів EMT [34], тоді як надекспресія NEDD9 у клітинах аденокарциноми легені лінії A549 супроводжується зростанням їх інвазивності та здатності до метастазування [33]. Схожим чином, надекспресія NEDD9 корелює зі стадією розвитку пухлини, кількістю метастазів та несприятливим прогнозом у пацієнтів з раком нирок [35]. В той же час, надекспресія адаптерного протеїну p130^{Cas} асоційована з розвитком гормонозалежних пухлин. Показано, що при дії естрогену на естроген-залежні клітини карциноми молочної залози людини лінії T47D, p130^{Cas} взаємодіє з естрогеновим рецептором, а також активує проонкогенні кінази Src і Erk1/2 [36]. На тваринній моделі було встановлено, що надекспресія p130^{Cas} веде до посилення проліферації та стійкості до апоптозу пухлинних клітин грудної залози за рахунок активації сигнальних шляхів Src, Akt та Erk1/2 [37]. Також, взаємодія p130^{Cas} з BCAR3 (Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3) веде до

активації Rac1, і, як наслідок, до посилення рухливості та інвазивності клітин раку молочної залози [38]. На зразках раку простати було продемонстровано кореляцію між рівнем експресії p130^{Cas} і стадією розвитку пухлини та наявністю метастазів у лімфовузлах [39]. При цьому, пригнічення експресії p130^{Cas} на моделях *in vitro* супроводжувалось пригніченням рухливості клітин раку простати ліній DU145 і PC3 [28, 40, 41].

Ще один сигнальний шлях, надмірна активація якого характерна для злоякісно трансформованих клітин, - це каскад MAP-кіназ (mitogen-activated protein kinase), один з еволюційно найдревніших сигнальних шляхів, який контролює ключові процеси в клітинах: ріст, проліферацію, диференціювання, рухливість та апоптоз. Серед шести описаних груп MAP-кіназ, група кінази Erk1/2 (extracellular signal-regulated kinase) є дослідженою найкраще, адже порушення цього сигнального шляху є характерними для приблизно третини з усіх випадків онкологічних новоутворень [42]. Для сигнального шляху Erk1/2 відомо декілька адаптерів/скафолдів, які виконують різноманітні функції. Наприклад, IQGAP1 і KSR забезпечують локалізацію компонентів сигнальних комплексів Raf, MEK та ERK поблизу мембрани, MP-1 і β -арестини – в ендосомах, Sef – у везикулах комплексу Гольджі. Регулювання клітинної відповіді в часі при взаємодії рецептора родини факторів росту нервів, TrkA, з лігандом, відбувається шляхом активації MAPK каскаду за двома механізмами: тривалим, який за участі Rap1 модулює інтегрин-опосередковану адгезію та утворення міжклітинних контактів за участі кадгеринів, та тимчасовим, який активується також і при дії епідермального фактора росту EGF, і залучає адаптерний протеїн Grb2. До регулювання сили клітинної відповіді залучений Ste5 дріжджів, який контролює інтенсивність «мейтингового» сигналювання залежно від локалізації на мембрані чи в цитозолі [43]. Окрім того, мутації чи зміни в експресії адаптерних/риштувальних протеїнів часто асоційовані з розвитком та прогресією онкологічних захворювань. Наприклад, адаптерний протеїн Grb2 (Growth Factor Receptor-bound protein 2), SH2 домен якого може взаємодіяти з активованими РТК (в тому числі EGFR, HGFR, PDGFR) чи

нерецепторними тирозинкіназами (такими як FAK, Abl), зв'язується з фактором обміну гуанінових нуклеотидів Sos1, який забезпечує обмін GDP/GTP для малої GTP-ази Ras. В такий спосіб, внаслідок активації рецептора Grb2 зв'язе і локалізує Sos1 поблизу мембрани, що призводить до переходу Ras в активну форму і подальшої активації ланок MAPK каскаду – Raf, Mek1/2, Erk1/2. Зазначений механізм контролює низку функцій, залучених до розвитку та прогресії раку: контроль клітинного циклу і проліферацію, рухливість, адрезивність та ангиогенез [44]. У багатьох солідних пухлинах, а також при лейкозах, виявлено дуплікацію локусу Grb2, що знаходиться на 17 хромосомі (q22) [45], надекспресію Grb2 виявлено в зразках раку грудної залози [46] та клітинних лініях раку грудної залози [47], сечового міхура [48], простати [49]. Зважаючи на участь адаптерного протеїну Grb2 у патогенезі пухлин різного походження, були розроблені механізми, спрямовані на пригнічення сигналювання, залежного від Grb2. В першу чергу, це препарати-антагоністи SH2-доменів, які б блокували зв'язування Grb2 з активованими рецепторами до факторів росту [50]. Так, у 2007 році з'явилась публікація [50] про те, що застосування антагоністів SH2 домену Grb2 веде до пригнічення рухливості клітин раку простати *in vitro*, а також до пригнічення ангиогенезу та метастазування *in vivo*. Також, розроблено пептиди, які конкурентно блокують зв'язування з SH3 доменами Grb2 і таким чином унеможливають його асоціацію з Sos1. Показано, що застосування таких блокувальних пептидів у пацієнтів з хронічним мієлоїдним лейкозом (CML) викликало пригнічення проліферації пухлинних клітин [51, 52].

Ще один адаптер сигнального шляху MAPK, KSR1 (kinase suppressor of Ras 1), складається з надспіралізованого домену, консервативних районів, збагачених на пролін, цистеїн і серин/треонін, та псевдокіназного домену. Цей протеїн здатний зв'язуватись із усіма трьома компонентами Raf/MEK/ERK каскаду, що забезпечує їх коректне взаємне розташування, активацію і навіть формування негативного зворотного зв'язку [53]. Показано, що зростання вмісту KSR1 веде до підвищення активності сигналювання, залежного від проонкогенної GTP-ази

Ras, до максимального рівня [54]. Так, у клітинних лініях раку прямої кишки надекспресія KSR1 асоційована з посиленням активації Erk1/2 та виживаністю пухлинних клітин, а пригнічення експресії KSR1 супроводжувалось зниженням здатності пухлинних клітин формувати колонії в напіврідкому агарі, що свідчить про зниження їх трансформувального потенціалу, та до формування пухлини *in vivo* [55]. Також, на культурі ембріональних фібробластів миші продемонстровано, що KSR1 є необхідним для підтримання здатності клітин до росту в неприкріпленому стані [56]. Участь KSR1 у розвитку Ras-залежних новоутворень робить його перспективною мішенню для дії протипухлинних препаратів [53]: пригнічення експресії KSR1 за допомогою антисенсових олігонуклеотидів супроводжувалось зменшенням розмірів Ras-індукованої пухлини підшлункової залози та пригніченням метастазування [57], а пригнічення експресії KSR1 у клітинах лінії карциноми прямої кишки HCT116 за допомогою малих інтерферуючих РНК (siRNA) вело до пригнічення життєздатності *in vitro* та пригнічення здатності формувати пухлини *in vivo* [56].

Наведені приклади доводять, що адаптерні протеїни є не лише активними регуляторами сигналювання клітини (в тому числі й онкогенного), але й можуть виступати як мішені для дії протипухлинних препаратів з метою пригнічення активності конкретних сигнальних шляхів.

1.2 Будова та функції адаптерного протеїну Ruk/CIN85

1.2.1 Будова та особливості експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 належить до родини CIN85/CMS, і складається з трьох SH3 доменів (А, В і С) на N-кінці молекули, збагаченого на пролін району та надспіралізованого домену на С-кінці молекули [58] (рис. 1.2, Б). Таку структуру має найдовша з ізоформ, яка у людини має назву CIN85 (Cbl-interacting protein of 85 kDa) [59], а в гризунів Ruk (regulator of ubiquitous kinase) [60], однак описано й інші ізоформи, які характеризуються відсутністю одного чи кількох SH3 доменів та збагаченого на пролін району [61]. Також відомі ізоформи, специфічні для певних тканин: наприклад,

SETA (src homology 3 (SH3)-encoding, expressed in tumorigenic astrocytes) експресується в астроцитах [62], CD2BP3 (CD2 binding protein 3) є специфічною для Т-лімфоцитів [63], RukT експресується лише в клітинах яєчка, RukH – лише в серці [61]. Будову описаних ізоформ адаптерного протеїну Ruk/CIN85 наведено на рис. 1.2, А. Порівняння послідовностей гена, який кодує Ruk/CIN85 в людини, миші та щура показало, що рівень ідентичності послідовностей сягає від 92% до 97% [58], а порівняння послідовностей відповідних протеїнів за допомогою ресурсу Protein Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) виявило рівень ідентичності 88%, що свідчить про надзвичайно високу подібність цього гена і протеїну в наведених організмах, тому в літературі (і в даній дисертаційній роботі) використовують назву Ruk/CIN85 для позначення цього адаптера як в людини, так і в миші чи щура.

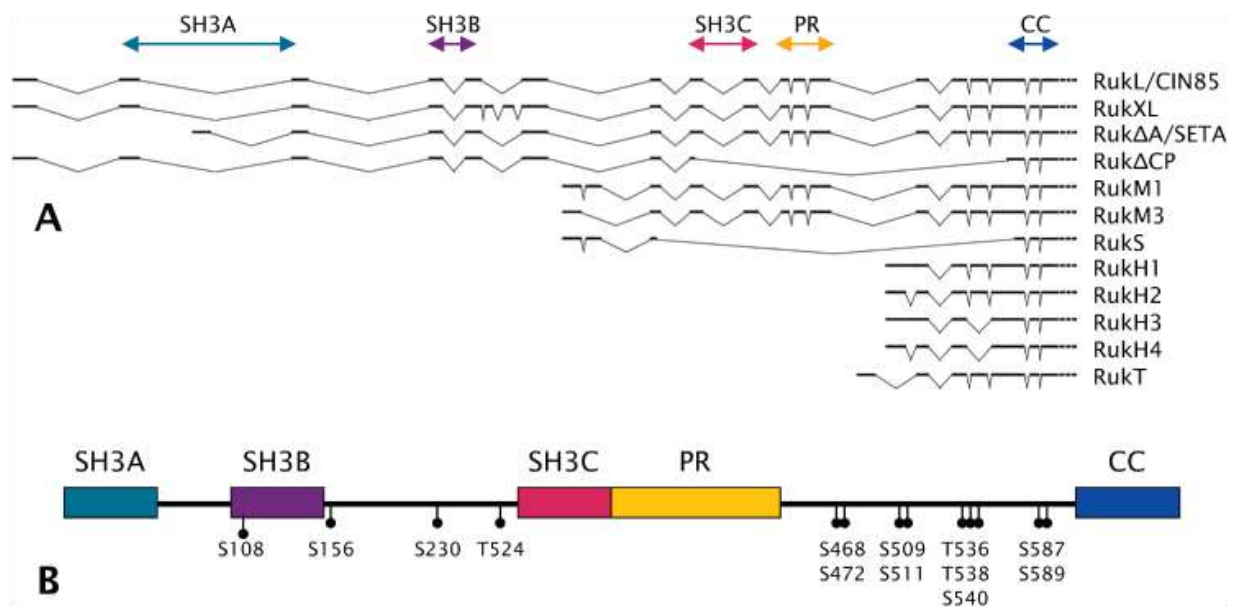


Рис. 1.2 Доменна організація та ізоформи адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (за [61]). А – Будова транскриптів відомих ізоформ Ruk/CIN85. Б – будова протеїну Ruk/CIN85, крапками позначені центри посттрансляційної модифікації (фосфорилування) Ruk/CIN85. Позначення: PR – збагачений на пролін район, CC – надспіралізований домен, S – залишок амінокислоти серину, T – залишок амінокислоти треоніну

Ruk/CIN85 кодується геном *SH3KBP1* (SH3-domain kinase binding protein 1), який у людини (а також миші і щура) локалізований на X хромосомі [64]. За даними ресурсів NCBI Gene (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/), Uniprot (www.uniprot.org/), та Ensembl (www.ensembl.org/), його ортологи знайдені у всіх класах багатоклітинних тварин, в тому числі у ссавців – людини та інших приматів, гризунів, свині, бика тощо. Ген *SH3KBP1* містить 18 екзонів, шляхом альтернативного сплайсингу [64] може утворюватись 9 транскриптів, два з яких є некодуючими, адже не мають відкритої рамки зчитування, а інші 7 відрізняються між собою за довжиною та наявністю окремих екзонів (www.ensembl.org/). В даній роботі розглядаються функції повнорозмірної форми Ruk/CIN85, яка кодується найдовшим транскриптом (www.ensembl.org/). Ген *SH3KBP1* експресується в усіх органах і тканинах людини, найвищий рівень його експресії детектовано в клітинах крові, лімфовузлах, жировій тканині, низький – в скелетних м'язах, нирках, серці, органах травного тракту (www.ensembl.org/, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). Аналіз розподілу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 між компартментами клітини показав, що різні ізоформи Ruk/CIN85 виявляються в цитоплазмі, в тому числі асоційовані з цитоскелетом, в ядрі та асоційовані з ядерною мембраною, що свідчить про динамічний перерозподіл ізоформ Ruk/CIN85 між внутрішньоклітинними компартментами [65].

Відомо, що зміни в рівні експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 асоційовані з різними патологічними процесами. Зростання експресії Ruk/CIN85 встановлено у пухлинних клітинах різного походження, а також корелює з рівнем їх злоякісності [61]. Окрім цього, Біан та співавтори продемонстрували зв'язок надекспресії Ruk/CIN85 в стріатумі та чорній речовині мозку з розвитком хвороби Паркінсона [66], а Тенг та колеги показали, що надекспресія Ruk/CIN85 є причиною діабетичної нефропатії, тоді як пригнічення Ruk/CIN85 веде до зниження протеїнурії [67], що робить його потенційною мішенню для лікування наслідків цукрового діабету.

1.2.2 Зв'язувальні партнери адаптерного протеїну Ruk/CIN85

До складу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 входять три SH3 домени, які взаємодіють зі збагаченими на пролін районами протеїнів-партнерів, збагачений на пролін район, який слугує центром для зв'язування SH3 доменів, а також суперспіралізований “coiled coil” домен, який бере участь у димеризації з іншими протеїнами, що містять такий домен [58].

З даних літератури відомо, що домени SH3A та SH3B можуть взаємодіяти зі збагаченим на пролін районом тієї ж молекули Ruk/CIN85, формуючи «закриту» конформацію, у якій зв'язувальні домени SH3A, SH3B та SH3C, а також збагачений на пролін район недоступні для взаємодії з потенційними протеїнами-партнерами [63, 68]. Існує гіпотеза, що переходи між «закритою» і «відкритою» конформаціями регулюються шляхом посттрансляційних модифікацій, таких як фосфорилювання/дефосфорилювання та убіквітилювання [61]. Також, С-кінцевий надспіралізований домен може брати участь в олігомеризації Ruk/CIN85, чи у формуванні комплексу з іншим протеїном цієї родини CD2AP/CMS [69, 70]. Окрім цього, Zhang і співавтори продемонстрували, що надспіралізований домен може взаємодіяти з фосфатидною кислотою, що забезпечує асоціацію Ruk/CIN85-вмісних комплексів з мембраною [71].

Пошук зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85 за допомогою бази даних BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) виявив 275 зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85 і 461 взаємодію за участі Ruk/CIN85. Переважна більшість протеїнів-партнерів взаємодіє з SH3 доменами Ruk/CIN85, серед них виявлено інші адаптерні протеїни (в тому числі ті, що мають структурні модулі, що взаємодіють з ліпідами, актином), структурні протеїни, регуляторні протеїни, протеїнкінази, інозитол-5'-фосфатази, E3 убіквітинлігази, компоненти сигналювання G протеїнів, мембранні рецептори, та протеїни, що мають ДНК-зв'язувальні домени [58, 61]. Аналіз протеїнів, з якими взаємодіють SH3 домени Ruk/CIN85, виявив, що більшість із цих протеїнів локалізовані на мембрані або ж взаємодіють з цитоскелетом, і залучені до регулювання таких процесів, як

внутрішньоклітинне сигналювання, організація і біогенез елементів цитоскелету, адгезивність, везикулярний транспорт, регулювання запрограмованої клітинної загибелі, контроль клітинного циклу, дозрівання і сплайсинг РНК [72]. Збагачені на пролін домени Ruk/CIN85 беруть участь у взаємодії з деякими адаптерними протеїнами (Crk, Grb1, субдиницею РІЗК p85 α , ендofilінами E1-E3, інтерсектином 1), протеїнкіназами (Fgr, Fyn, Hck, Lyn, Src) [58, 61].

1.2.3 Функції адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Першою з описаних і найкраще досліджених функцій адаптерного протеїну Ruk/CIN85 є його участь в ендцитозі та сортуванні активованих РТК. Вперше Ruk/CIN85 був ідентифікований саме як протеїн-партнер убіквітинлігази E3 Cbl, звідки й походить його назва CIN85 - c-Cbl-interacting protein with a molecular mass of 85 kDa [73]. Було показано, що димеризація і автофосфорилування EGFR внаслідок його взаємодії з лігандом супроводжується приєднанням Cbl, який каталізує поліубіквітилювання EGFR і таким чином регулює його ендцитоз. Фосфорилування Cbl веде до зміни його конформації, внаслідок чого стає можливою взаємодія між збагаченим на пролін районом Cbl і трьома SH3 доменами Ruk/CIN85. У свою чергу, Ruk/CIN85 зв'язує ендofilіни, які регулюють ендцитоз шляхом зміни кривизни та вгинання мембрани, забезпечуючи початкові етапи інтерналізації РТК [58, 61, 74-76]. Окрім Cbl і ендofilінів, Ruk/CIN85 взаємодіє з мембраною шляхом зв'язування надспіралізованого домену з фосфатидною кислотою [71], що додатково стабілізує комплекс активованого EGFR з молекулярною машинерією ендцитозу та мембраною [77]. Відомо також, що Cbl у комплексі з Ruk/CIN85 моноубіквітилює Ruk/CIN85, що спрямовує весь комплекс на шлях ендцитозу і подальшої лізосомної деградації [58, 61, 68, 75, 78, 79]. Схема взаємодії Ruk/CIN85 з Cbl та його участь в ендцитозі активованого EGFR представлена на рис. 1.3. Аналогічно, продемонстровано, що Ruk/CIN85 бере участь в ендцитозі та спрямуванні на шлях деградації інших РТК, а саме

дофамінового рецептора D2DR [80], рецептора IgE [81], рецептора фактора росту гепатоцитів c-Met [82], рецептора тромбоцитарного фактора росту PDGF та c-Kit [58]. З іншого боку, показано, що деякі інші протеїни, залучені до ендоцитозу, наприклад, Sprouty2 [83], Dab2 [84], Alix/AIP1 [85], можуть конкурентно взаємодіяти з компонентами комплексу Cbl-Ruk/CIN85-EGFR-ендофіліни і інгібувати ендоцитоз і деградацію активованого EGFR [61].

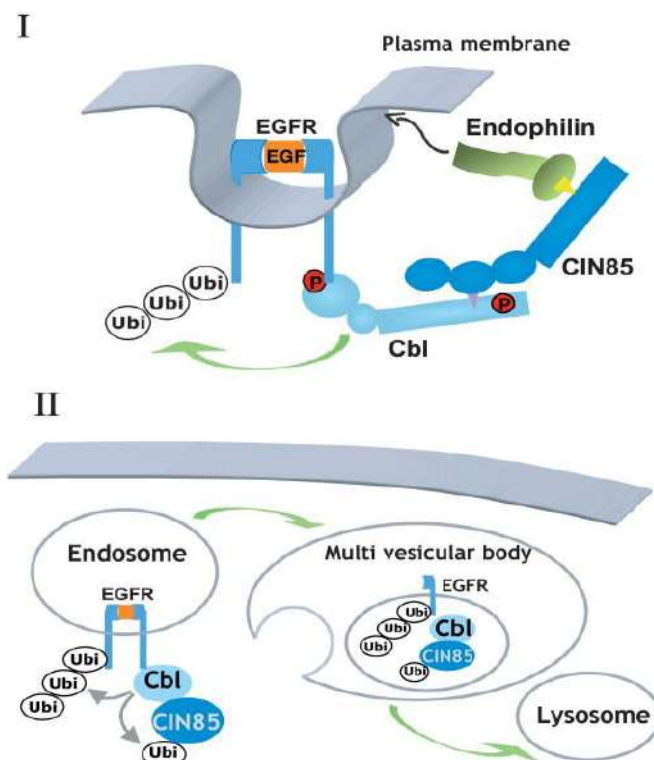


Рис. 1.3 Роль адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в ендоцитозі (I) і сортуванні в мультивезикулярні тільця (II) активованого EGFR (за [58])

Ще одна з функцій адаптерного протеїну Ruk/CIN85 – це негативна регуляція активності фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K) шляхом взаємодії з її регуляторною субодиницею p85 α [60], що й відображає назва цього адаптера – Ruk (regulator of ubiquitous kinase). Було показано, що Ruk/CIN85 формує гомодимер, а його SH3 домени і збагачений на пролін район бере участь у взаємодії з p85 α [86].

Ruk/CIN85 також залучений до сигналювання, залежного від трансформувального фактора росту β , TGF β . Показано, що SH3 домени

Ruk/CIN85 безпосередньо зв'язуються з рецептором T β RI після взаємодії з лігандом, тоді як T β RII не потребує активації для зв'язування з Ruk/CIN85. Така взаємодія веде до зростання кількості рецепторів до TGF β , презентованих на мембрані клітини, і, як наслідок, до посилення залежного від TGF β сигналювання [87].

Накопичено значну кількість доказів, які свідчать про те, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до контролю клітинної адгезії та міграції. Так, показано, що Ruk/CIN85 безпосередньо взаємодіє з F-актином, і, разом із близькоспорідненим протеїном CMS, бере участь у зшиванні фібрилярного актину у пучки (actin bundling), тоді як втрата надспіралізованого та збагаченого на пролін районів Ruk/CIN85 супроводжується пригніченням міграції подоцитів [70]. Також, збагачений на пролін район Ruk/CIN85 взаємодіє з іншими молекулами, які беруть участь в організації актинового цитоскелету, а саме з p130^{Cas} [63] та кортактином [88], а за допомогою ділянки між збагаченим на пролін районом та надспіралізованим доменом Ruk/CIN85 взаємодіє з протеїном CAPZ, який зв'язує плюс-кінець актину (actin-capping protein) і таким чином контролює міграцію клітин [89]. Показано також, що Ruk/CIN85 опосередковує ефект циклін-залежної кінази 5 (Cdk5) на динаміку актинового цитоскелету через взаємодію з Cdk5-залежним протеїном Dab2 [90].

Ruk/CIN85 безпосередньо взаємодіє з елементами комплексу фокальної адгезії, а саме з кіназами FAK та Pyk2, які забезпечують адгезію клітин до субстрату. З іншого боку, взаємодія Ruk/CIN85 з AIP1/Alix, навпаки, інгібує формування комплексів фокальної адгезії і знижує адгезивність клітин [91]. Фосфорилування AIP1/Alix за участі нерцепторної тирозинкінази Src пригнічує здатність AIP1/Alix взаємодіяти з Ruk/CIN85 і таким чином стимулює адгезію [92], що дозволяє розглядати Ruk/CIN85 як Src-залежний модулятор формування комплексів фокальної адгезії. Для ортолога Ruk/CIN85 у дрозофіли, протеїну Cindr, показано, що він бере участь у формуванні міжклітинних контактів і ремоделюванні актинового цитоскелету клітин сітківки у процесі ембріогенезу ока [93].

Ruk/CIN85 може бути також залучений до контролю клітинної загибелі. З одного боку, через безпосередню взаємодію з Src, Ruk/CIN85 асоційований з рецептором фактора некрозу пухлин TNFR1, що забезпечує більшу чутливість клітин до TNF α -індукованого апоптозу [94]. В літературі є дані стосовно взаємодії Ruk/CIN85 з MAPKKK MEKK4, що веде до активації MAPK p38, яка залучена до відповіді клітини на стрес [95] і є ключовим регулятором балансу між виживанням клітини за умов стресу і загибеллю шляхом апоптозу [96, 97]. Інше дослідження [98] демонструє, що комплекс Ruk/CIN85 з Src і Cbl активує сигнальний шлях TRAIL/MEKK4/p38/HSP27/Akt, який, навпаки, індукує виживання клітин при дії проапоптичного цитокіна TRAIL.

Таким чином, шляхом взаємодії з численними молекулами-партнерами, адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до контролю низки клітинних процесів: ендоцитозу і сортування в ендосоми активованих РТК, проліферації, клітинного циклу, апоптозу, адгезії, рухливості, реорганізації актинового цитоскелету (рис. 1.4).

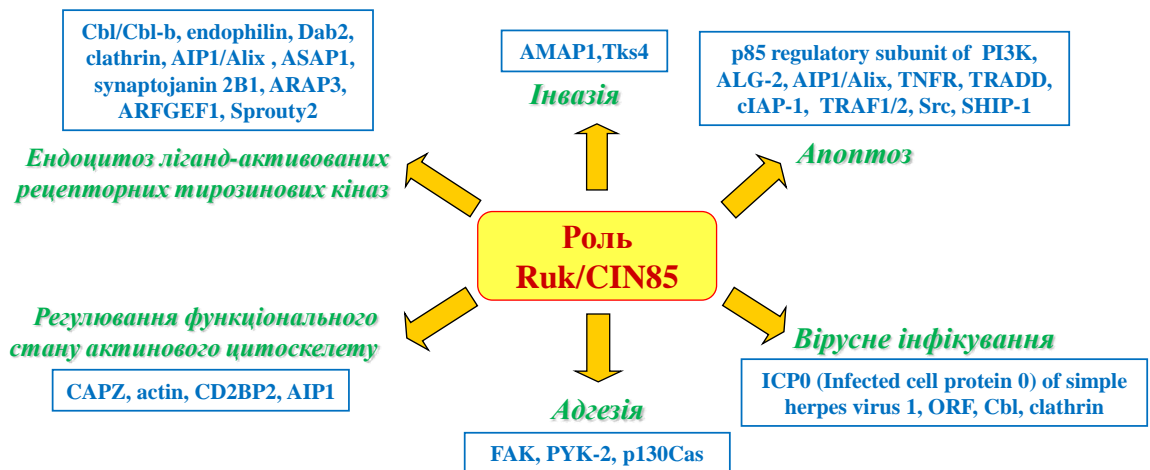


Рис. 1.4 Функції адаптерного протеїну Ruk/CIN85

1.2.4 Участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в канцерогенезі

Накопичено значну кількість даних про те, що рівень експресії та/або вміст Ruk/CIN85 зростає у пухлинних клітинах у порівнянні з відповідними нормальними тканинами. Так, показано, що рівень експресії Ruk/CIN85 у зразках карциноми грудної залози [8, 99], шийки матки [100], простати [87],

товстої кишки [101], голови та шиї [102], гліомах [62] вищій, ніж в нормальних тканинах, причому надекспресія Ruk/CIN85 корелює з високою інвазивністю пухлинних клітин та метастазуванням. Аналіз вмісту повнорозмірної форми Ruk/CIN85 у клітинних лініях різного походження показав, що найбільшим вмістом Ruk/CIN85 характеризуються клітини лімфолейкозу L1210, лімфоми Беркітта Ramos, карциноми шийки матки HeLa S3, гліоми щура C6, та гістіоцитарної лімфоми U937, тоді як у нормальних фібробластах миші лінії NIH3T3 вміст Ruk/CIN85 дуже низький, а в клітинах низькоінвазивної аденокарциноми легені людини лінії A549 практично не детектується [103], що свідчить про зв'язок між рівнем експресії Ruk/CIN85 та ступенем злоякісної трансформації клітини.

За умов *in vivo*, пухлинні клітини переважно перебувають у стані гіпоксії, і змушені адаптуватись до гіпоксичних умов. Основним транскрипційним фактором, який контролює біологічну відповідь як нормальної, так і злоякісно трансформованої клітини на гіпоксію, є HIF-1 (hypoxia induced factor), що складається з двох субодиниць - HIF-1 α і HIF-1 β . Стабільність HIF-1 α залежить від парціального тиску кисню. За умов нормоксії пролілгідроксилаза (PHD) гідроксильє HIF-1 α за залишками проліну P402 і P564, що супроводжується зв'язуванням убіквітинлігази VHL і протеасомною деградацією HIF-1 α . За умов гіпоксії гідроксилювання не відбувається, HIF-1 α залишається стабільним і в комплексі з HIF-1 β контролює експресію низки генів, регулюючи таким чином метаболізм клітини (GLUT-1, GSK), ангіогенез, васкулогенез (VEGF, MMPs, ANG-2, SDF-1), апоптоз (p53, BNIP-3), епітелійно-мезенхімний перехід і метастазування (CXCR4, CDH1, CAIX, LOX, MMPs) [104, 105]. Опубліковано свідчення того, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 може реалізувати свої функції через транскрипційний фактор HIF-1, посилюючи стабільність HIF-1 α . Так, показано, що надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 супроводжується стабілізацією HIF-1 α навіть за умов нормоксії [106]. Нещодавно було продемонстровано, що Ruk/CIN85 безпосередньо взаємодіє з пролілгідроксилазою PHD2, до взаємодії залучені

SH3 домени Ruk/CIN85 і збагачений на пролін та аргінін район на N-кінці PHD2. Таке зв'язування веде до пригнічення активності PHD2 і, як наслідок, до стабілізації HIF-1 α та активації HIF-1 α -залежних процесів [107]. В той же час, втрата центру взаємодії пролілгідроксилази PHD2 з Ruk/CIN85 супроводжується пригніченням злоякісних властивостей клітин MDA-MB231, а саме їх проліферативного потенціалу, рухливості, здатності формувати колонії, росту пухлини та ангіогенезу *in vivo* [107].

Співробітниками відділу сигнальних механізмів клітини раніше встановлено, що Ruk/CIN85 індукує експресію інгібітора активатора плазміногену (PAI1) за участі HIF-1 α [106], який залучений до розвитку гострих тромбозів, атеросклерозу тощо [107], а також розглядається як маркер поганої виживаності та несприятливого прогнозу у хворих з раком грудної залози [109].

1.3 Молекулярні механізми метастазування пухлинної клітини

1.3.1 Загальна характеристика процесу метастазування

Процес розповсюдження пухлинних клітин з первинної пухлини і подальша колонізація віддалених органів і тканин – це багатоступеневий процес, що має назву каскад інвазії-метастазування [110] і включає в себе локальну інвазію первинних пухлинних клітин у навколишні тканини; інтравазування цих клітин в систему кровообігу і виживання в кровотоці; арешт і екстравазування через стінки судин в паренхіму віддалених тканин; утворення мікрометастатичних колоній в тканині органа-мішені; подальшу проліферацію клітин мікрометастазів з утворенням обширних метастазів, які можуть бути виявлені клінічно (цей останній етап має назву колонізація) [111].

На початкових етапах метастазування пухлинні клітини набувають ознак, які забезпечують їх здатність залишати первинну пухлину і мігрувати до віддалених органів. Одним з центральних процесів, які відбуваються на цьому етапі, є епітелійно-мезенхімний перехід (EMT) - програма розвитку, яка індукується під час ембріогенезу, і загоєння епітеліальних тканин у дорослих, а у випадку ракових клітин надає їм множинних злоякісних ознак, пов'язаних із

втратою епітелійних властивостей і набуттям натомість мезенхімних властивостей [112].

Карциномні клітини, що вийшли з первинних пухлин, можуть інтравазувати в кровотік у вигляді окремих циркулюючих клітин, або ж клітинних кластерів. Кровотік – це агресивне середовище для циркулюючих пухлинних клітин, де зростає ризик фрагментації клітин внаслідок фізичних навантажень, що виникають під час їх транспорту. Також, у кровотоці пухлинні клітини швидко стають мішенями природних кіллерів (NK-клітин). Тому, для захисту від несприятливих факторів, пухлинні клітини взаємодіють із тромбоцитами крові, за рахунок присутності на їх поверхні тканинного активатора [113]. Тромбоцити фізично екранують ракові клітини від NK-клітин, а також пригнічують їх активність, продукуючи TGF- β і PDGF (фактор росту тромбоцитів) [113, 114]. Окрім цього, тромбоцити можуть індукувати сигналювання пухлинних клітин: TGF- β , який вивільнюється в результаті дегрануляції тромбоцитів, активує залежне від NF- κ B сигналювання, що викликає (чи підтримує) ЕМТ [115]. Після активації ракових клітин, тромбоцити можуть впливати і на клітини ендотелію шляхом активації сигналювання, залежного від пуринергічних рецепторів P2Y2 [115] і селектинів [117], і, таким чином, збільшувати проникність судин для пухлинних клітин. Вивільнення хемокінів з активованих тромбоцитів рекрутує нейтрофіли, які потім можуть посилювати екстравазування пухлинних клітин і колонізацію дистантних органів [118]. Показано, що циркулюючі пухлинні клітини можуть потрапляти в позаклітинні пастки нейтрофілів (NETs) або безпосередньо взаємодіяти з нейтрофілами, що посилює виживання пухлинних клітин в кровотоці, їх адгезію до ендотеліоцитів та екстравазування [119, 120].

Екстравазування передбачає проходження карциномних клітин через бар'єр ендотеліальних клітин – цей процес називається трансендотеліальною міграцією (TEM) [121]. Відомо, що під впливом TGF- β , що продукується активованими тромбоцитами, клітини карциноми грудної залози набувають здатності продукувати подібний до ангіопоетину фактор ANGPTL4, який

підвищує проникність судин легені, полегшує ТЕМ і таким чином посилює метастазування [122]. Карциномні клітини можуть також продукувати чинники, які порушують цілісність судин, і таким чином полегшують як інтра-, так і екстравазування. До таких чинників належать VEGF, матриксні металопротеїнази, ADAM12 [121, 123]. Також було показано, що рекрутування моноцитів відіграє функціональну роль в екстравазуванні пухлинних клітин. Зокрема, рекрутування CCR2⁺ прозапальних моноцитів у відповідь на секрецію CCL2 пухлинними клітинами полегшує екстравазування і подальше метастазування в легені [124, 125].

Парадоксально, але лише невелика частина клітин, які інтравазували в кровотік, виявляються здатними колонізувати дистантний орган і формувати макрметастаз: експериментальні дані свідчать, що ефективність метастазування після після внутрішньовенного введення пухлинних клітин становить всього 0,01% [126]. Решта клітин або гине, або переходить в метастатично неактивний «сплячий» стан [127, 128], після виходу з якого все ж може формувати метастази, що й стає причиною рецидивів. Виявилось, що здатність формувати дистантні метастази визначається наявністю ознак ракових стовбурових клітин (CSCs), а саме здатності виживати в неприкріпленому стані, активації синальних шляхів, характерних для ембріональних плюрипотентних клітин та резистентності до протипухлинної терапії [111].

Попри необхідність ЕМТ і прояву ознак CSCs для метастатичної колонізації дистантних органів, клітини карциномних метастазів, як правило, повторюють ключові гістопатологічні ознаки відповідних первинних пухлин, в тому числі й їхні епітелійні властивості [129]. Така властивість пояснюється тим, що після «роумінгу» в дистантний орган ракові клітини піддаються зворотному до ЕМТ процесу – мезенхімно-епітелійному переходу, МЕТ, який дозволяє відновити багато клітинних ознак, які були втрачені під час попереднього проходження через ЕМТ, і реконструювати ієрархію клітинних субпопуляцій, подібних до тих, які були у вихідній первинній пухлині [129]. Експериментальні дані свідчать про те, що такий перехід дійсно відбувається

при переході від ранньої колонізації до росту метастазів, і є необхідним для метастазування карциномних клітин [4, 130-132].

1.3.2 Епітелійно-мезенхімний перехід (EMT)

Епітелійно-мезенхімний перехід (EMT) - це невід'ємна частина морфогенезу в ембріональному розвитку, яка також залучена до процесів загоєння ран, фіброзів і метастазування ракових клітин. Епітелійні (і подібні до епітелійних карциномні) клітини характеризуються наявністю численних міжклітинних контактів, а саме щільних, адгезивних і щілинних контактів, десмосом, які формуються молекулами адгезії, такими як E-кадгерин, цитокератини тощо. Ще однією ознакою епітелійних клітин є апікально-базальна полярність. Особливістю EMT є втрата епітелійних ознак і набуття мезенхімного фенотипу, що супроводжується посилення рухливості й інвазивності [133, 134]. За фізіологічних умов індукторами EMT можуть бути різноманітні сигнальні механізми, а саме трансформувальний фактор росту бета TGF- β , WNT, NOTCH, а також сигнальні шляхи, залежні від РТК. TGF- β , що продукується пухлинними клітинами і стромальними фібробластами в мікрооточення пухлини, вважається первинним індуктором EMT [135]. Інші чинники, що можуть брати участь у індукції EMT, - це прозапальні цитокіни, такі як TNF- α , через транскрипційний фактор NF- κ B [136] і IL-6/STAT шлях [137]; гіпоксія через HIF-1 α [138]; і жорсткість позаклітинного матриксу (ECM) [139]. У відповідь на сигнали, що індуюють EMT, в пухлинній клітині активуються транскрипційні фактори – регулятори EMT. Основні EMT-ТФ включають родини ТФ, що містять домен «цинковий палець» - SNAIL (SNAIL1 та SNAIL2/SLUG) і ZEB (ZEB1 і ZEB2), а також ТФ, що містять базальний helix-loop-helix домен родини TWIST (TWIST1 і TWIST2) [133]. Родини ТФ SNAIL і ZEB здатні зв'язуватися з послідовностями E-box у промоторах E-кадгерину і пригнічувати транскрипцію цього гена [140, 141]. Для SNAIL і ZEB також було показано, що вони регулюють експресію протеїнів щільних контактів,

таких як окклюдин, клаудин, ZO-1 і коннексини JAM1/A [142-144]. З іншого боку, члени родини TWIST пригнічують експресію E-кадгерину через індукцію транскрипційних факторів SNAIL як у дрозофіли, так і у людини [145, 146]. Крім того, було виявлено, що TWIST1 індукує біогенез інвадоподій, сприяючи таким чином деградації базальної мембрани під час ЕМТ [139]. Отже, транскрипційні фактори родин TWIST, SNAIL і ZEB пригнічують експресію «епітелійних» генів, і активують експресію «мезенхімних» генів (рис. 1.5).

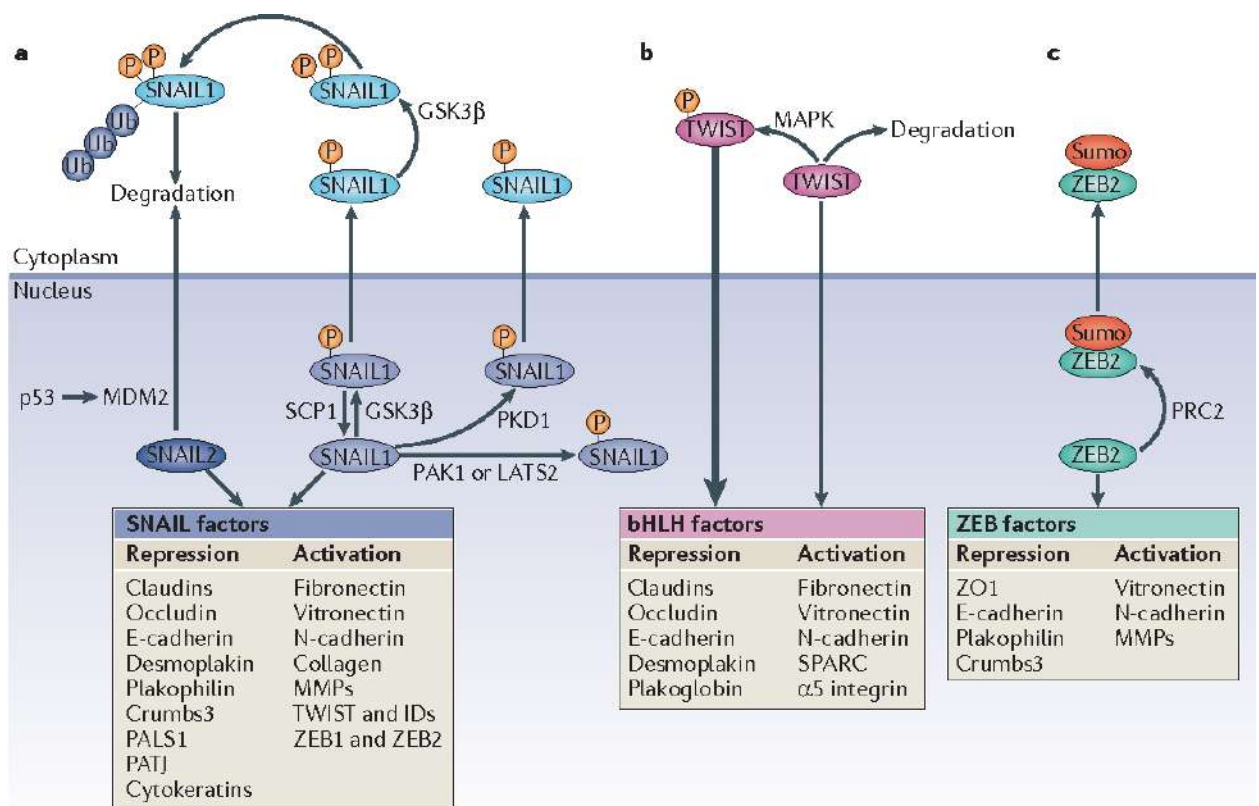


Figure 2 | Roles and regulation of major EMT transcription factors. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is driven by

Рис. 1.5 Механізми регулювання ЕМТ за участі транскрипційних факторів родин TWIST, SNAIL і ZEB [151]

Під час ЕМТ відбувається втрата клітинних контактів і апікально-базальної полярності, що дозволяє пухлинній клітині відкріпитись і набути рухливості з метою подальшої інвазії і метастазування. Руйнування щільних контактів під час ЕМТ супроводжується зниженням експресії клаудину і окклюдину, та втратою ZO1/TJP1 в зонах міжклітинних контактів [147]. Під час

дестабілізації адгезивних контактів, епітелійний кадгерин (Е-кадгерин) від'єднується від плазматичної мембрани і піддається деградації [148], внаслідок чого β -катенін більше не може взаємодіяти з Е-кадгерином, і або також деградує, або у відповідь на сигналювання WNT може брати участь у контролі транскрипції [149]. Також, під час ЕМТ також порушується структура десмосом і щільних контактів [142, 147]. Протягом ЕМТ експресія молекул міжклітинних контактів пригнічується на транскрипційному рівні, за рахунок чого досягається стабільна втрата епітелійних ознак [150].

В клітинах, які зазнають ЕМТ, спостерігається реорганізація кортикального актинового цитоскелету, що забезпечує динамічну елонгацію клітин і їх спрямовану рухливість [148]. Клітина формує збагачені на актин листоподібні мембранні виступи, які називаються ламелоподіями, із шилоподібними виступами – філоподіями. Також утворюються інвадоподії – збагачені на актин вигинання мембрани, які мають функцію протеолітичної деградації ЕСМ, що сприяє інвазії пухлинних клітин [152]. До того ж, клітини, у яких відбувається ЕМТ, характеризується підвищеною скоротливістю тіла і формуванням актинових волокон. Ці динамічні зміни в організації актину, ймовірно, опосередковуються регуляторними білками, такими як мезин [153].

Малі GTP-ази родини Rho регулюють динаміку актинового цитоскелету і контролюють перегрупування актину під час ЕМТ. Серед них RhoA сприяє утворенню актинових стресових фібрил, тоді як Rac1 і Cdc42 переважно сприяють утворенню ламелоподій і філоподій [152]. Після активації Rho, Rho-асоційована кіназа (ROCK) у комплексі з DIA1 активує полімеризацію актину. ROCK також індукує фосфорилування легкого ланцюга міозину, який підсилює скоротливу активність міозину і активує кіназу LIM (LIMK), яка, в свою чергу, активує протеїн деполімеризації актину кофілін [154]. Rho GTP-ази також регулюють утворення міжклітинних контактів і клітинну адгезію. У процесі ЕМТ утворюється катенін p120, який пригнічує Rho, що сприяє полегшенню дисоціації міжклітинних контактів і призводить до активації Rac і Cdc42, які контролюють формування мембранних протрузій і рухливість клітин

[155]. Перехід від апікально-базальної до передньо-задньої полярності (англ. front-rear polarity) передбачає взаємодію між GTP-азами Rho і протеїнами, що визначають апікально-базальну полярність. PI3K відіграє центральну роль у ініціюванні передньо-задньої полярності і бере участь у рекрутуванні факторів обміну гуанілових нуклеотидів для Cdc42 і Rac до переднього краю клітини [156, 157]. Реорганізація комплексів архітектури цитоскелету та комплексів полярності, які призводять до зміни форми клітин, їх елонгації, формування виступів мембрани, появи передньої і задньої полярності, є істотними для ЕМТ і дозволяють спрямовувати міграцію.

Дослідження останнього десятиліття засвідчили важливу роль ЕМТ у сприянні метастазуванню пухлинних клітин. Усунення мезенхімних пухлинних клітин або інгібування їх росту в поєднанні з традиційними методами лікування, які націлені на епітелійну популяцію, може бути найпридатнішою стратегією для боротьби зі станом часткового ЕМТ і неоднорідності пухлини, які лежать в основі хіміорезистентності і метастазування [133]. На сьогодні з метою пригнічення ЕМТ та/або боротьби з мезенхімним фенотипом пухлинних клітин, застосовуються агенти, скеровані на пригнічення різноманітних ланок ЕМТ – регуляторних транскрипційних факторів, індукторів ЕМТ, ефекторних кіназ, регуляторних мікроРНК тощо [158]. До таких інгібіторів ЕМТ належать, наприклад, інгібітори HIF-1 α , лізилоксидази, інгібітори взаємодії з відповідним рецептором TGF β , IL6, HGF, FGF, PDGF, Hedgehog, Wnt, Notch, блокувальні антитіла проти інтегринів, інгібітори сигналювання, залежного від Src, PI3K/Akt/mTOR, FAK, RAS/RAF/MAPK, інгібітори транскрипційних факторів NF- κ B, STAT, індуктори мікроРНК miR-34a, інгібітори деацетилаз тощо [158].

1.3.3 Різні типи міграції пухлинних клітин

Залежно від типу клітини і тканинного мікрооточення, пухлинні клітини можуть мігрувати двома основними способами: індивідуально, коли міжклітинні контакти між мігруючими клітинами відсутні, або колективно, як багатоклітинні групи, коли міжклітинні адгезивні контакти зберігаються [1].

При обох типах міграції рушійною силою є динаміка зв'язку компонентів цитоскелету з рецепторами поверхні клітини, які взаємодіють з позаклітинним середовищем [159]. Загалом, пухлинні клітини використовують ті ж типи і механізми міграції та інвазії, що й нормальні нетрансформовані клітини [161], проте пухлинні клітини здебільшого нечутливі до фізіологічних сигналів, які пригнічують міграцію і забезпечують адгезію клітини [160].

Пітер Фрідл з університету Радбоуд, Нідерланди, розробив схему індивідуальної міграції пухлинної клітини, яка складається з п'яти взаємозалежних молекулярних кроків, які змінюють форму клітини, її положення та структуру тканини, через яку вона мігрує [161]. На першому етапі цитоскелет поляризується шляхом полімеризації актину, що супроводжується формуванням протрузій на лідерному боці клітини, протилежному кінці від зони, яка стане заднім кінцем клітини [162]. На другому етапі відбувається взаємодія лідерного краю клітини з компонентами позаклітинного матриксу, що веде до формування кластерів фокальної адгезії і зчеплення молекул адгезії з компонентами внутрішньоклітинного механосигналювання [163]. Третій крок полягає у локальному протеолізі протеїнів позаклітинного матриксу за кілька мікрон попереду від лідерного краю клітини. Цей протеоліз модифікує молекулярні та механічні властивості тканини і створює простір для подальшого руху клітини. На 4 етапі мала GTP-аза з родини Rho активує міозин II, і скорочення, опосередковане актоміозиновим комплексом, генерує напруження всередині клітини. На 5 етапі це скорочення стимулює підтягування задньої частини клітини, тоді як передній край виступає далі вперед [163]. У багатьох клітин поступальний рух переднього краю клітини контролюється малими GTP-азами Rac або Cdc42, які беруть участь у формуванні псевдоподій або філоподій, що взаємодіють з компонентами ЕСМ [164]. Водночас, інші клітини, які проявляють низьку активність Rac або перебувають в середовищах зі слабкою адгезією, характеризуються оберненим порядком кроків 1 і 2. При цьому передній край клітини формує блебноподібні вип'ячування мембрани. Ці вип'ячування стабілізуються кортикальним F-

актином і інтеркалюють між структурами ЕСМ [165]. Ці два способи міграції відображають мезенхімний (Rac-залежний) і амебоїдний (Rac-незалежний) типи міграції.

Мезенхімний тип міграції використовують, окрім пухлинних клітин, фібробласти, кератиноцити, та ендотеліоцити. Клітини з мезенхімним типом моторики мають специфічну витягнуту веретеноподібну форму. При культивуванні у 3D-матриці такі клітини поляризуються, формуючи провідний (передній, лідерний) край клітини з однією або декількома псевдоподіями і тілом клітини, що відстає, які помітно відрізняються на мікрофотографіях [166]. Швидкість міграції мезенхімних клітин у 3D-матриці становить приблизно 0,1–0,5 мкм/хв [167] (табл. 1). Така відносно низька швидкість міграції зумовлена досить повільними перебудовами фокальних контактів під час транслокації [168].

Амебоїдний тип міграції названий «на честь» специфічного типу моторики амеби *Dictyostelium sp.*, який характеризується циклами розширення і стиснення тіла клітини, опосередкованих кортикально локалізованим актином і міозином [169]. Амебоїдна міграція у вищих еукаріот описана для лейкоцитів [170] та деяких типів пухлинних клітин [171-173]. Пухлинні клітини, що характеризуються амебоїдним способом міграції, мають характерну округлу форму. Ці клітини рухаються в 3D-матриці незалежно від деградації ЕСМ [166, 172, 174]. Низька адгезивність до субстрату дає можливість клітинам, які рухаються за амебоїдним типом, рухатись з високою швидкістю, від 2 мкм/хв для клітин меланоми A375m2 [171] до 25 мкм/хв для лімфоцитів [175] (табл. 1).

У відповідь на дію мікрооточення пухлинна клітина може змінювати тип міграції з мезенхімного на амебоїдний (мезенхімо-амебоїдний перехід, МАТ) і навпаки (амебоїдно-мезенхімний перехід, АМТ). На молекулярному рівні МАТ/МЕТ переходи контролюються малими GTP-азами Rho, Rac та Cdc42 [166, 176]. Відомо, що міграція/інвазія за амебоїдним типом значною мірою залежить від скоротливості актин-міозинового комплексу, що підтримується

шляхом активації сигналювання малої GTP-ази Rho/ROCK [171, 172]. Пригнічення сигнального шляху Rho/ROCK у амебоїдних пухлинних клітинах було ключовим механізмом, необхідним для того, щоб викликати амебоїдно-мезенхімний перехід. Так, інактивація Rho або ROCK в клітинах меланоми A375m2 з амебоїдним фенотипом призводить до переходу до мезенхімної морфології [171]. Важливим регулятором сигналювання Rho/ROCK, що регулює скоротливість кортикального актину, є 3-фосфоінозитид-залежна протеїнкіназа 1 (PDK1), яка позитивно впливає на активність ROCK1 на плазматичній мембрані. PDK1 конкурує з RhoE, негативним регулятором ROCK1, і таким чином сприяє ROCK1-залежній організації актоміозину. Пригнічення PDK1 в клітинах меланоми A375m2 призводить до видовженої мезенхімної форми і порушення рухливості клітини [177]. Cdc42-залежне сигналювання також відіграє важливу роль у підтриманні амебоїдного способу міграції пухлинних клітин. Показано, що інгібування регулятора Cdc42 DOCK10 або його низхідних ефекторів N-WASP і PAK2 призводить до амебоїдно-мезенхімного переходу [178]. Мезенхімна міграція залежить від сигналювання GTP-ази Rac1, яка забезпечує відповідну поляризацію клітини, організовує полімеризацію актину і утворення ламеліподій [159, 179]. Спрямованість руху клітин підтримується Cdc42, яка координує полімеризацію актину в передній частині клітини з прикріпленням і вирівнюванням мікротрубочок [159, 180]. Роль RhoA/ROCK у мезенхімній міграції є комплексною і недостатньо вивченою: з одного боку, її активність повинна бути пригніченою, проте RhoA/ROCK сигналювання є необхідним для підтягування задньої частини клітини, що відстає [159, 181].

Між сигналюванням Rac і Rho існує взаємний антагонізм, що встановлює регуляторний перехід між мезенхімним і амебоїдним фенотипами. Санз-Морено та співавтори виявили протеїн DOCK3, який функціонує як Rac1-GEF (фактор обміну гуанілових нуклеотидів) та NEDD9 – адаптерний протеїн з родини p130Cas, що взаємодіє з DOCK3, а також Rac –залежний протеїн WAVE2, що стимулює нуклеацію актину [182]. Морфологія мезенхімної

клітини визначається шляхом NEDD9/DOCK3-опосередкованої активації Rac1. Видовження клітини і полімеризація актину опосередковується нижче WAVE2 у відповідь на активацію Rac1. Також, WAVE2 пригнічує RhoA-залежну скоротливість актоміозину, блебінг і амебоїдний фенотип. Сигналювання клітин, що рухаються за амебоїдним типом, реалізується через каскад GTP-ази RhoA і залежної від неї кінази ROCK. Активация Rho/ROCK пригнічує прояви мезенхімного фенотипу через інгібування Rac1 шляхом активації Rac-GAP (протеїну-активатора GTP-аз) ARHGAP22, завершуючи тим самим схему антагонізму Rac1-RhoA [176].

Таблиця 1.

Порівняльна характеристика мезенхімного та амебоїдного типів міграції [166]

	Мезенхімна міграція	Амебоїдна міграція
Морфологія клітини	Витягнута, веретеноподібна	Округла
Адгезія до ЕСМ	Сильна, інтегринові кластери на мембрані формують точки фокальної адгезії	Слабка, інтегрини дифузно розташовані на мембрані
Міграція крізь ЕСМ	Деградація і ремоделювання ЕСМ	Незалежна від протеолізу, протиснення між волокнами ЕСМ
Організація актинового цитоскелету	На лідерному кінці – актинова сітка, по всьому тілу клітини – стрес-фібрили	Скоротливий кортикальний актин
Швидкість переміщення	Низька	Висока
Рух клітини	Псевдоподії, філоподії	Інтенсивний блебінг

1.3.4 Епітелійно-мезенхімна пластичність (ЕМП)

Клітини різного походження, і особливо пухлинні клітини, здатні залучати епігенетичні/онтогенетичні програми, що дозволяють їм адаптуватися до змін навколишнього середовища. Ця властивість має назву пластичності, і часто пов'язана з різними стратегіями переміщення в тканинах [183, 183].

Епітелійно-мезенхімна пластичність включає в себе низку процесів трансдиференціювання, які забезпечують адаптацію пухлинних клітин до умов мікрооточення: епітелійно-мезенхімний перехід (ЕМТ), мезенхімо-амебоїдний перехід (МАТ), та мезенхімно-епітелійний перехід (МЕТ) [2].

Близько 80% всіх злоякісних новоутворень людини – це карциноми, тобто пухлини епітелійного походження, які мають ознаки епітелійної тканини, такі як експресія відповідних цитокератинів і Е-кадгерину. Проте, карциномні клітини пухлин на пізніх стадіях та пухлин, які метастазують, мають мезенхімну або (найчастіше) змішану епітелійно-мезенхімну морфологію, що супроводжується посиленням рухливості, інвазивності і хіміорезистентності пухлинних клітин, внаслідок проходження в цих клітинах ЕМТ [2]. Цікаво, що здатність пухлинних клітин до ЕМТ значною мірою корелює з проявом ознак ракових стовбурових клітин [2, 184]. З іншого боку, МАТ/МЕТ, властивий для високорухливих пухлинних клітин, може індукуватись у відповідь на запалення, застосування хіміотерапевтичних агентів, наприклад, інгібіторів металопротейназ, активацію інтегринів, пригнічення/активацію сигналювання Rho та Rac [176, 166, 176], забезпечуючи оптимальний спосіб міграції/інвазії відповідно до стану позаклітинного матриксу. «Хоумінг» і проліферація у дистантному органі потребує відновлення молекулярних ознак, властивих для первинної пухлини, що відбувається внаслідок МЕТ, необхідного для фінальних етапів метастазування [185].

Сучасні дослідження демонструють, що пластичність пухлинних клітин є ключовою для метастазування і резистентності до протипухлинних препаратів [1, 2]. Відповідно, триває пошук молекулярних мішеней для таргетної терапії, скерованої на пригнічення ЕМП. Серед потенційних мішеней виділяють,

наприклад, сигналювання, залежне від Notch та MAP-кіназ, що дозволяє пригнічувати проліферацію різних субпопуляцій пухлинних клітин і таким чином блокувати ріст пухлини [186].

1.3.5 Ракові стовбурові клітини (CSCs) та їх роль у метастазуванні

Згідно з сучасними уявленнями про біологію пухлинного росту, пухлина є гетерогенною структурою, що складається з клітин різних субпопуляцій, які відрізняються за своїми властивостями. Однією з таких субпопуляцій є ракові стовбурові клітини (Cancer stem cells, CSCs; інша назва – клітини, що ініціюють розвиток пухлини (англ. – Tumor initiating cells, TICs) – це невелика популяція пухлинних клітин, здатних до самовідтворення. CSCs дають початок іншим клітинам пухлини, які й стають мішенями для протипухлинної терапії [187, 188]. Для CSCs є характерними такі властивості: активація низки сигнальних шляхів, таких як Wnt, Notch, Hedgehog, PI3K/Akt, NF- κ B, JAK/STAT [189, 190], експресія транскрипційних факторів, властивих для недиференційованих клітин (наприклад, Klf4, Oct4, Nanog, Sox2) [191], здатність проліферувати незалежно від підложки (ця властивість проявляється у здатності формувати тривимірні структури (сфероїди) у неприкріпленому стані за умов клонального пропагування у безсироватковому детермінованому середовищі) [192, 193], високий туморогенний потенціал [194, 195], експресія специфічних поверхневих маркерів (для ракових стовбурових клітин грудної залози це CD44, CD24, CD133 [196]), а також резистентність до радіо- та хіміотерапії [197-199]. Саме завдяки підвищеній резистентності до протипухлинних препаратів ракові стовбурові клітини можуть виживати тоді, коли інші пухлинні клітини загинули, та згодом реініціювати ріст пухлини та спричиняти рецидив.

Описано кілька механізмів розвитку резистентності CSCs до хіміотерапії: по-перше, це експресія мембранних ABC (ATP-binding cassette) транспортерів, до яких належать P-глікопротеїн/MDR1 (multidrug resistance-1)/ABCB1, MRP1 (multidrug resistance protein 1)/ABCC1, BCRP (breast cancer resistance protein)/ABCG2. Ці транспортери мають широку субстратну

специфічність і забезпечують АТР-залежний «еффлокс» протипухлинних препаратів із клітини і таким чином підтримують концентрацію препарату нижчою за токсичну. Іншим механізмом є підвищена активність ензиму альдегіддегідрогенази (ALDH), яка окислює внутрішньоклітинні альдегіди до відповідних кислот і залучена до знешкодження таких протипухлинних препаратів як циклофосфамід та його аналогів 4-гідропероксициклофосфамід та іфосфамід шляхом детоксифікації проміжного продукту обміну цих сполук – альдофосфаміду – до карбоксифосфаміду. Зважаючи на те, що значна частина протипухлинних препаратів діють через активацію клітинної загибелі внаслідок пошкодження молекули ДНК (наприклад, цисплатин зумовлює виникнення перехресних зшивок, метотрексат є інгібітором синтезу ДНК, доксорубіцин та даунорубіцин є інгібіторами топоізомерази), то ще одним із механізмів резистентності CSCs до хіміотерапії є зменшення рівня пошкодження ДНК клітини, яке може відбуватись за кількома шляхами: регулювання прогресії клітинного циклу, посилення системи репарації ДНК, та попередження пошкодження ДНК активними формами кисню [197].

Між проявом ознак CSCs і епітелійно-мезенхімним переходом існує тісний регуляторний взаємозв'язок. Було показано, що індукція EMT у нормальних іморталізованих епітеліоцитах веде до зростання кількості клітин, що мають ознаки CSCs, а саме наявності поверхневих маркерів та здатності до формування сфероїдів [200], тоді як індукція EMT у пухлинних клітинах супроводжується зростанням розмірів популяції CSCs та посилення резистентності таких клітин до хіміотерапії [200, 201].

Окрім того, саме CSCs здатні до формування вторинних вогнищ пухлинного росту (метастазів). Показано, що активація у цих клітинах «ембріональних» сигнальних шляхів, таких як Wnt і Notch [202, 203], забезпечує колонізацію дистантних органів і ріст метастазів. На моделі аденокарциноми легені миші виявлено, що метастазування тісно пов'язане з програмою дедиференціювання, яка індукується втратою експресії Nkx2-1,

подібно до стовбурових клітин [204, 205] Таким чином, метастатичний потенціал карциномних клітин залежить від наявності клітин у транспортних системах організму (кров, лімфа), які проявляють ознаки CSCs [206, 207].

Зважаючи на визначальну роль CSCs у метастазуванні та підтриманні хіміорезистентності, основним недоліком традиційних протипухлинних препаратів є те, що їхня дія спрямована на загальний пул «диференційованих» пухлинних клітин, внаслідок чого неураженими залишаються CSCs, які й дають в подальшому початок росту новій пухлині. Існує щонайменше три потенційних шляхи впливу на CSCs: інгібування сигнальних шляхів, залучених до контролю самовідтворення, що дозволяє індукувати, в такий спосіб, диференціювання або апоптоз CSCs; вплив на механізми забезпечення резистентності; вплив на комплекс специфічних умов оточення CSCs [208]. На сьогодні активно розробляються препарати, спрямовані на кожен із цих шляхів [209].

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Обладнання та реагенти

У ході роботи було використано наступні реагенти:

Для культивування субліній клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 використовували середовище RPMI 1640 («Gibco», США), ембріональну сироватку теляти (FBS) («HyClone», США), суміш стандартних антибіотиків пеніциліну та стрептоміцину («Gibco», США).

Для Вестерн-блот аналізу і флуоресцентної конфокальної мікроскопії використовували перші поліклональні антитіла до SH3A домену Ruk [103], K1-3 фрагменту плазміногену щура [210]), моноклональні антитіла до віментину («Sigma», США), Е-кадгерину («Cell Signaling», США), Ki67 («Santa Cruz Biotechnology, Inc.», США), β -актину («Sigma», США), анти-мишачі та анти-кролячі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Promega», США) та з флуорохромом AlexaFluor488, AlexaFluor594 («Invitrogen», США), кон'югований з TRITC фалоїдин («Sigma», США), розчини для ECL детекції («Amersham», Велика Британія).

Для ізолювання РНК, зворотної транскрипції і кількісної ПЛР використовували наступні праймери і реагенти: набір для ізолювання тотальної РНК innuPREP RNA mini Kit («Analytik Jena AG», Німеччина), оліго-дТ(18) праймер, праймери до мРНК генів миші *Sh3kbp1/Ruk/CIN85*, *Vim*, *Cdh1*, *Twist1*, *Snai1*, *Zeb1*, *Zeb2*, *Lcn2*, *Myb*, *Klf17*, *Tjp1*, *Icam1*, *Tgfb1*, *Fnl*, *Itgb1*, *Cfl1*, *Il1a*, *Tnfa*, *Il6*, *Ccl2*, *Cxcl5*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Mmp14*, *Ctsnd*, *Plau*, *Plaur*, *Serpine1*, *Cd44*, *Cd24*, *Pou5f*, *Klf4*, *Sox2*, *Myc*, *Nanog*, *Id1*, *Lox*, *Loxl2*, *Gapdh* («BioLabTech Ltd», Україна), набори для синтезу кДНК RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit та кількісної ПЛР Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix («Thermo Scientific», США).

Інвазивність клітин досліджували з використанням вставок з розміром пор 0,8 мкм («Greiner Bio-One», Австрія) та розчинів Матригелю («BD Biosciences», США), колагену I типу («Sigma», США) і фібронектину («BD Biosciences», США).

У процесі проведення досліджень використовували наступні прилади: центрифуга Eppendorf 5804/ 5804 R («Eppendorf», Німеччина), настільна центрифуга MiniSpin («Eppendorf», Німеччина) CO₂ інкубатор BioSpherix («BioSpherix, Ltd.» США), систему для вертикального електрофорезу Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra («Bio-Rad Laboratories», США), систему для горизонтального електрофорезу Bio-Rad Mini-Sub Cell GT («Bio-Rad Laboratories», США), спектрофотометр DeNovix («DeNovix Inc.», США), прилад для кількісної ПЛР qTower 2.0 («Analytical Jena AG», Німеччина), прилад для ПЛР T-Cy («Creacon Technologies», Нідерланди), лазерний скануючий конфокальний мікроскоп LSM 510 META («Carl Zeiss», Німеччина), прилад для оцінки міграції клітин xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument («Roche», США), прилад для оцінки хемілюмінесценції FLx800 («BioTek», США).

2.2 Методи досліджень

2.2.1 Культивування еукаріотичних клітин

Клітини аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 культивували в середовищі RPMI 1640 (Gibco®), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (FCS, HyClone), 50 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну, при температурі 37 °C та 5% CO₂ у зволоженій атмосфері. Клітини пасажували у співвідношенні 1:3-1:5 кожні 2-3 дні при досягненні 70-80% конфлюенту.

2.2.2 Одержання субліній клітин лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85

З метою отримання субліній, що надекспресують Ruk/CIN85, клітини 4T1 трансфікували методом кальцій-фосфатної трансфекції плазмідною pRc/CMV2-Ruk1, що кодує повнорозмірну форму Ruk/CIN85 [60], або вектором без вставки для отримання контрольної сублінії. Після трансфекції клітини піддавали селекції за присутності 1 мг/мл генетицину (G418) («Sigma», США). З метою

зниження рівня експресії Ruk/CIN85 клітини 4T1 інфікували лентивірусом, що кодує Ruk/CIN85-специфічну shRNA, використовуючи конструкцію pLKO.1-shRuk/CIN85 R22 [211]. Щоб отримати відповідний контроль, клітини 4T1 були інфіковані лентивірусом, що кодує shRNA, неспецифічну до жодної постідовності геному ссавців. Інфіковані клітини піддавали селекції у присутності 10 мкг/мл пуроміцину («Sigma», США). Резистентні до генетицину або пуроміцину клітини субклонували, оцінювали вміст та експресію повнорозмірної форми Ruk/CIN85 Вестерн-блот аналізом та за допомогою кількісної ПЛР. Було обрано дві сублінії клітин 4T1, які стабільно надекспресували Ruk/CIN85 (названі RukUp-1 і RukUp-2) та одну сублінію з пригніченням експресії Ruk/CIN85 (RukDown). Відповідні контролю (Mock і Scr) являють собою резистентні до генетицину чи пуроміцину клітини 4T1, трансфіковані плазмідною без вставки або інфіковані неспецифічним лентивірусом.

2.2.3 Отримання лізатів клітин

Клітини лізували в буфері лізису (50 мМ Трис-НСІ, рН 7.5, 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 1 мМ ортованадат натрію, 50 мМ NaF, 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 1 мкг/мл пепстатину, 60 мкг/мл апротиніну, 10 мкг/мл лейпептину) на льоду протягом 20 хв. Тритон-нерозчинну фракцію осаджували центрифугуванням при 10 000 g протягом 30 хв при 4°C. Після центрифугування лізатів вміст протеїну в супернатанті визначали за допомогою комерційного набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Після цього лізати клітин прогрівали при температурі 95°C протягом 5 хв у буфері для зразків Леммлі (62,5 мМ Трис-НСІ, рН 6.8, 1 мМ ЕДТА, 2% ДСН, 5% β-меркаптоетанол, 10% гліцерин, 0.4% бромфеноловий синій). Отримані лізати зберігали при температурі не вище -70°C.

2.2.4 Електрофорез протеїнів в ПААГ та Вестерн-блот аналіз

Для приготування 10% гелю для розділення та 4,5% гелю для концентрування протеїнів використовували наступні реактиви:

Розчин мономерів «АА»: 30% акриламід/0,8% метиленбісакриламід;
 Буфер А для розділяючого гелю: 3М Трис-НСІ, рН 8.8;
 Буфер Б для концентруючого гелю: 0,5М Трис-НСІ, рН 6.8;
 10% розчин додецилсульфату натрію (ДСН);
 10% розчин персульфату амонію (АПС);
 Електродний буфер: 25 мМ Трис-НСІ, рН 8.3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН;
 Компоненти, необхідні для приготування гелю, змішували у кількостях, наведених у Таблиці 2.

Таблиця 2

Приготування поліакриламідного гелю

Т, %	Буфер А, мл	Буфер Б, мл	АА 30%, мл	Н ₂ О, мл	ДСН 10%, мл	ТЕМЕД, мкл	АПС 10%, мл	Об'єм гелю, мл
10	0,75	-	2	3,18	0,06	6	0,06	6
4,5	-	0,5	0,3	1,162	0,02	2	0,02	2

Лізати клітин вносили за допомогою мікрошприца на дно комірок концентруючого гелю з розрахунку 50 мкг протеїну на один трек. Протеїни розділяли електрофорезом при 15-25 мА (70-110 В), після чого переносили на нітроцелюлозну мембрану у буфері для переносу (25 мМ Трис-НСІ, рН 8.3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол) протягом 90 хв при силі струму 250 мА.

Для блокування вільних центрів зв'язування мембрану інкубували у блокувальному розчині (5% знежирене сухе молоко, 1% Tween-20, ЗФР (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,8 мМ NaH₂PO₄, рН 7,4)) протягом 1 години при КТ. Після цього мембрану інкубували з поліклональними антитілами проти Ruk/CIN85 [103], моноклональними антитілами проти віментину (Sigma-Aldrich), Е-кадгерину (Cell Signaling), поліклональними антитілами проти фрагменту K1-3 плазміногену щура [210], та моноклональними антитілами проти β-актину (Sigma-Aldrich) протягом 12-16 год при 4°C. Відповідні другі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (IgG (Promega)), використовували в розведенні

1:3000. Мембрану інкубували протягом 45 хв при КТ, після чого імунореактивні смуги виявляли за допомогою комерційного набору для підсиленої хемілюмінесценції ECL (enhanced chemiluminescence kit) (Amersham Pharmacia Biotech). Час експозиції мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 1-15 хв. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику і фіксували кислим фіксажем. Для виявлення імунореактивних смуг плазмінотену та його фрагментів використовували реакцію з 3,3'-діамінобензидином (ДАБ). Денситометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics, <http://gel-pro-analyzer.software.informer.com/3.1/>).

2.2.5 Ізолювання та оцінювання якості РНК

Тотальну РНК виділяли з клітин колоночним методом, використовуючи комерційний набір innuPREP RNA mini Kit (Analytical Jena AG, Німеччина). Для цього осад клітин ($1 \cdot 10^6$) лізували в 400 мкл буфера для лізису при КТ протягом 5 хв, після чого лізат наносили на колонку D (для видалення геномної ДНК) і центрифугували за допомогою настільної центрифуги MiniSpin (Eppendorf, Німеччина) протягом 2 хв при 10 000 g при КТ. До фільтрату додавали 400 мкл 70% етанолу, перемішували, наносили на колонку R (для виділення РНК), і центрифугували протягом 2 хв при 10 000 g при КТ. Після цього мембрану колонки R промивали 500 мкл буфера для відмивки HS з подальшим центрифугуванням протягом 1 хв при 10 000 g при КТ, і 700 мкл буфера для відмивки LS з подальшим центрифугуванням протягом 1 хв при 10 000 g при КТ. Колонку R центрифугували протягом 1 хв при 10 000 g ще раз для того, щоб остаточно висушити і позбутись залишків буфера для промивки, після чого проводили елюцію РНК водою ступеня очищення milliQ: безпосередньо на мембрану наносили 50 мкл води, інкубували протягом 1 хв при КТ, після чого колонку R переносили у стерильну пробірку для елюції і центрифугували протягом 2 хв при 10 000 g

при КТ. Концентрацію РНК вимірювали за поглинанням при 260 нм за допомогою спектрофотометра DeNovix (DeNovix Inc., США).

Якість отриманої РНК оцінювали за ступенем деградації смуг рибосомних РНК після електрофоретичного розділення в агарозному гелі, а також за поглинанням при 260/230 нм і 260/280 нм.

2 мкг РНК змішували з денатуруючим буфером (95% формаїд, 18 мМ ЕДТА, 0.025% ДСН, ксиленціанол, бром феноловий синій) та 1 мкл бромистого етидію (10 мг/мл), інкубували при температурі 72 °С протягом 10 хв, та вносили в лунки гелю. Електрофорез РНК проводили в буферній системі ТАЕ (40 мМ Трис-ацетат, рН 8.5, 2мМ ЕДТА) в 1% агарозному гелі при напрузі 5В/см довжини гелю. Візуалізацію зон РНК здійснювали опроміненням гелю ультрафіолетовим світлом з довжиною хвилі 384 нм. Для визначення розміру РНК використовували ДНК-стандарти фірми "Fermentas". Оцінювали інтенсивність смуг, що відповідають 28S та 18S рРНК: якщо інтенсивність верхньої смуги (28S рРНК) удвічі перевищувала інтенсивність нижньої, і між ними не було помітних смуг, то виділену РНК вважали нативною і придатною для подальшої роботи. Додатково оцінювали поглинання при 260/230 нм та 260/280 нм. Оптимальним значенням поглинання при 260/280 нм вважали 2, якщо значення були нижчими, то це свідчить про забруднення зразка протеїнами, які поглинають при 280 нм. Оптимальне значення поглинання при 260/230 нм становить 2,0-2,2, а зниження цього показника свідчить про забруднення зразка органічними сполуками, що поглинають при довжині хвилі 230 нм, в першу чергу фенолом.

2.2.6 Зворотна транскрипція

Для синтезу кДНК користувались комерційним набором RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила наступні компоненти: РНК – 1-5 мкг, 5x буфер

– 4 мкл, суміш 10 мМ dNTP – 2 мкл, Oligo-dT праймер – 1 мкл, інгібітор РНКаз Ribolock 20 U/mkl – 1 мкл, зворотна транскриптаза 200 U/mkl – 1 мкл.

Синтез кДНК проводили за наступних умов:

42°C – 60 хв,

95°C – 5 хв,

за допомогою приладу Т-Су (Creacon Technologies, Нідерланди).

2.2.7 Кількісна ПЛР

Для ПЛР в реальному часі використовували комерційний набір Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США) і ампліфікатор QTower 2.2 Real-Time PCR (Analytik Jena, Німеччина).

Реакційна суміш для кількісної ПЛР об'ємом 20 мкл містила наступні компоненти: кДНК – 2 мкл, 2x Master Mix – 4 мкл, прямий праймер 10 мкМ – 1 мкл, зворотний праймер 10 мкМ – 1 мкл, MilliQ H₂O – 12 мкл.

Ампліфікацію проводили в наступному температурному режимі:

- Початкова денатурація - 95°C, 10 хв.
- Ампліфікація (40 циклів):
 - Денатурація – 95°C, 15 сек.
 - Гібридизація - 60°C 30 сек.
 - Подовження - 72°C 30 сек.
- Плавлення – 60-90°C.

Послідовності праймерів, які використовувались для кількісної ПЛР, наведені у Таблиці 3.

Таблиця 3

Послідовності праймерів для кількісної ПЛР

Ген	Прямий праймер	Зворотний праймер
CCL-2	TTAACGCCCCACTCACCTGC	TTGGGTCAGCACAGACCTCTC
Catepsin D	CATCGCCTAAGACCACGGAG	GAGGGGACCCACAGGTTAGA
CD24	GCGAGCTTAGCAGATCTCCAC	CGGTGCAACAGATGTTTGGT
CD44	AGAGCACCCAGAAAGCTAC	GTAGTTGCACTCGTTGTGGG
CDH1	AACGCTCCTGTCTTCAACCC	GGGTTCTCGTTCTCCACTC

Cofilin	TGCGGCTCCTACTAAACGGA	CATCAGAGACAGCCACACCA
Cxcl5	CTGCGTTGTGTTTGCTTAAC	GACAGACCTCCTTCTGGTTT
Fn1	GTCAAGCTCATTTCCTGGTATGAC	CTTGCTCAGTGTCTTGCTG
GAPDH	CATCGACGCACCATCCAACC	TGGAAGGGTAACCAGTTGGGG
ICAM1	CCCCGCAGGTCCAATTCACA	CCAAGCAGTCCGTCTCGTCC
ID-1	CGACTACATCAGGGACCTGCA	GAACACATGCCGCCTCGG
IL1a	GCTTGAGTCGGCAAAGAAATCAA	ACGTTGCTGATACTGTCACCC
IL-6	GAGGATACTACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
Itgb1	AATGCCAAATCTTGCGGAGAA	GGCTGGCAACCCTTCTTTTT
KLF17	ACGCAGCCATTGTGGGATTA	GTATTGAGTGGCTGGTGGCT
KLF4	AACATGCCCGGACTTACAAA	TTCAAGGGAATCCTGGTCTTC
Lcn2	CCAGGCCCCAGGACTCAACTC	CCTGCCCCCGGAAGTACTGATCG
MMP2	CCCCATGAAGATCCAACCCA	GAAGTGCAGGGCTGTCCAT
MMP9	ACGACATAGACGGCATCCAG	TGGTTCAGTTGTGGTGGTGG
MMP13	ACCTGGACAAGCAGTTCCAAA	ATGGCTTTTGCCAGTGTAGGT
MMP14	CTGGCTCATGCCTACTTCCC	GGTTGAGGGGGCATCTTTGT
Myb	CATTTGATGGGGTTTGGGCA	AGGATAGGGAACGTGACTGGA
MYC	TAACCTCGAGGAGGAGCTGGA	GCCAAGGTTGTGAGGTTAGG
NANOG	TTGCTTACAAGGGTCTGCTACT	ACTGGTAGAAGAATCAGGGCT
Oct4	TAGGTGAGCCGTCTTTCCAC	GCTTAGCCAGGTTTCGAGGAT
PLAU	ACTACCGTGCTTCGGGAATG	GCCTGTTGCAGAGGTTTGTG
PLAUR	ACTACCGTGCTTCGGGAATG	GCCTGTTGCAGAGGTTTGTG
Ruk/CIN85	CGCCAACTTTCACGCTGCTT	TGACCTCACCCACGCTGATT
Serpine 1	GGCCGTGGAACAAGAATGAG	GCGTGTCTAGCTCGTCTACAG
SNAI1	TCTGAAGATGCACATCCGAAGCCA	AGGAGAATGGCTTCTCACCAGTGT
SOX2	CAGGAGAACCCCAAGATGCACAA	AATCCGGGTGCTCCTTCATGTG
TGFb	TGGAGCTGGTGAAACGGAAG	TAGATGGCGTTGTTGCGGTC
TJP/ZO1	GAGATGTTTATGCGGACGGTGG	GTTTCCTCCATTGCTGTGCT
TNFa	CCCACGTCGTAGCAAACCA	ACAAGGTACAACCCATCGGC
TWIST1	CTCAGCTACGCCTTCTCCGT	CCTCTGGGAATCTCTGTCCAC
Vimentin	GGATCAGCTACCAACGACA	AAGGTCAAGACGTGCCAGAG
Zeb1	GGAGGAGGTGACTCGAGCATTTAG	TAATACTGTCTGGTCTGCTGGC
Zeb2	AGACACTCTTGCGGAGGTTT	GTTCAACCACGTTTTTCTCCTG

Послідовності праймерів були підібрані за допомогою програми Oligo 7 таким чином, щоб температура плавлення становила 60 °С. Якщо ж температура плавлення була нижчою, то на етапі гібридизації встановлювали

температуру на 2-3 °С нижчу, ніж температура плавлення. Як референтний ген використовували GAPDH, і оцінку відносних рівнів експресії здійснювали методом $\Delta\Delta C_t$. Криву плавлення використовували для оцінки специфічності ампліфікації [212].

2.2.8 Дослідження проліферативної активності клітин 4T1

Життєздатність та проліферативну активність клітин 4T1 різних субліній оцінювали методами МТТ-тесту, прямого підрахунку та за кількістю Ki67-позитивних ядер.

Для МТТ-тесту клітини висівали у 96-лунковий планшет із розрахунку $1 \cdot 10^3$ клітин на лунку у 5 паралелях. Клітини культивували протягом 2, 24, 48 та 72 годин. Після цього клітини відмивали ЗФР двічі, додавали 100 мкл (0,4 мг/мл) МТТ-реактиву (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід) та інкубували при 37°C протягом 1 год. Отримані кристали формазану розчиняли в ДМСО, і вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 570/610 нм на спектрофотометрі μ Quant (BioTEK, США). Результати представляли у відносних одиницях, прийнявши за 1 значення поглинання для кожної сублінії на 2 годину.

Для прямого підрахунку $50 \cdot 10^3$ клітин висівали у лунки 12-лункового планшета у 3 паралелях і культивували протягом 24 і 48 год. Після цього клітини трипсинізували, ресуспендували у розчині трипанового синього і підраховували кількість клітин, використовуючи гемоцитометр Neubauer.

2.2.9 Дослідження адгезивності клітин лінії 4T1

Для дослідження адгезивних властивостей, клітини 4T1 різних субліній ресуспендували в середовищі для адгезії (RPMI 1640 з додаванням 1% BSA, 1 мМ MgCl₂, 0.5 мМ CaCl₂) і висівали у лунки 96-лункового планшета, попередньо покриті Матригелем (0,3 мг/мл, BD Biosciences), колагеном 1 типу (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich) або фібронектином (30 мкг/мл, BD Biosciences), з розрахунку $1 \cdot 10^5$ клітин на лунку у 3 паралелях. Клітини культивували протягом 30 хв, після

чого неприкріплені клітини змивали фосфатним буфером, а прикріплені фіксували 4% параформальдегідом і фарбували 0,4% кристалічним фіолетовим. Барвник розчиняли у 100 мкл 30% оцтової кислоти і вимірювали оптичну густину розчину при 590/630 нм на приладі μ Quant (BioTEK, США). Результати представляли у відносних одиницях, прийнявши за 1 значення адгезивності клітин 4T1 WT.

2.2.10 Дослідження міграційних властивостей клітин за допомогою тесту на заростання подряпини *in vitro*

2×10^5 клітин висівали у лунки 6-лункового планшета у повному середовищі RPMI 1640 і культивували до досягнення ними 90% конфлюенту. Після цього середовище замінювали на RPMI 1640, що містило 0.1% FCS на 14-16 год, і додавали 10 мкг/мл мітоміцину С (Sigma-Aldrich). Через 1 годину робили подряпину одноразовим стерильним наконечником об'ємом 200 мкл і фотографували місце подряпини. Через 24 год місце подряпини фотографували ще раз, і визначали ширину подряпини та ступінь її заростання за допомогою програми ImageJ software version 1.47h (<http://imagej.nih.gov/ij>). Для розрахунку коефіцієнта міграції М користувались формулою: $M = (W_0 - W_{24}) / W_0$, де W_0 і W_{24} – ширина подряпини на початку експерименту і через 24 год, відповідно.

2.2.11 Оцінювання інвазивності клітин *in vitro* з використанням модифікованої камери Бойдена

Оцінку інвазивності клітин проводили з використанням модифікованої камери Бойдена для 24-лункових планшетів, що містила напівпроникну мембрану з розміром пор 8 μ m (Greiner Bio-One, Австрія). Мембрану покривали із зовнішнього боку Матригелем (0,3 мг/мл, BD Biosciences), колагеном 1 типу (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich) або фібронектином (30 мкг/мл, BD Biosciences), після чого висівали у верхню камеру 3×10^4 клітин у 300 мкл середовища RPMI 1640, що містило 0.1% FCS. У нижню камеру додавали 600 мкл середовища RPMI 1640, що містило 10% FCS. Планшети інкубували протягом 24 годин, після чого

мембрани промивали фосфатним буфером, фіксували клітини, що промігрували на нижню сторону мембрани, 4% параформальдегідом і фарбували 0,4% кристалічним фіолетовим. Після цього фотографували як мінімум 10 полів зору при збільшенні 400х, і обраховували середню кількість клітин на поле зору.

Для дослідження ефекту ангіостатинів [213] на інвазивність клітин 4T1, клітини 4T1 сублінії RukUp-1 попередньо культивували за присутності $1,5 \times 10^{-7}$ М ангіостатинів K1-3 або K5 [213] протягом 24 год, після чого такі ж концентрації ангіостатинів додавали і в камеру Бойдена.

При вивченні ефекту інгібіторів металопротеїназ та серинових протеїназ на інвазивність клітини 4T1 сублінії RukDown попередньо культивували в присутності $1,3 \times 10^{-6}$ М інгібітора матриксних металопротеїназ GM6001 і/або 5×10^{-4} М інгібітора серинових протеїназ рNFGB, після чого такі ж концентрації інгібіторів додавали і в камеру Бойдена.

2.2.12 Отримання високоінвазивних субпопуляцій клітин 4T1

Для отримання високоінвазивних субліній, клітини 4T1 WT висівали у модифіковану камеру Бойдена (з мембраною, покритою шаром Матригелю) у кількості 1×10^5 клітин, після чого дозволяли їм мігрувати протягом 24 год. Для того, щоб зняти клітини, що промігрували на нижню сторону вставки, її інкубували у розчині 2 мМ ЕДТА протягом 3 хв, після чого клітини відмивали ЗФР і висівали на 6 см чашки Петрі у середовищі RPMI 1640. Таким чином було отримано високоінвазивну сублінію M1, на її основі таким же способом було отримано високоінвазивну сублінію M2.

2.2.13 Вивчення динаміки міграції та інвазії клітин з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Моніторинг міграції та інвазії клітин 4T1 в реальному часі здійснювали за допомогою приладу xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument, оснащеного платою CIM-plate 16 (Roche, США). Плата CIM-plate 16 є аналогом модифікованої камери Бойдена, проте на мембрані, через яку мігрують клітини,

розміщені електроди. Даний метод дозволяє оцінювати міграцію чи інвазію клітин через мембрану за зміною опору мембрани в реальному часі. Для експериментів на інвазію, мембрани плати CIM-plate 16 були покриті Матригелем (0,3 мг/мл, BD Biosciences), а для оцінки міграції мембрани не покривали жодним матриксом. Клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 та контрольні клітини висівали у верхню камеру у кількості $7,5 \times 10^4$ на лунку у середовищі RPMI 1640, що містило 0.1% FCS. У нижню камеру додавали середовище RPMI 1640, що містило 10% FCS. Також, як негативний контроль, ми використовували лунки, де в нижню камеру вносили середовище RPMI 1640, що містило 0.1% FCS, тобто не створювали градієнта концентрації FCS. Клітинний індекс (одиниці вимірювання міграції через мембрану, які відповідають опору мембрани) вимірювали кожні 10 або 15 хв протягом декількох годин. Для кількісної оцінки клітинний індекс у вказані часові точки розраховували як усереднене значення щонайменше з трьох незалежних вимірювань.

2.2.14 Оцінювання активності желатиназ MMP-2 і MMP-9 методом зимографії

Ензиматичну активність матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 оцінювали методом желатинової зимографії. Клітини висівали у 6 см чашки Петрі у повному середовищі RPMI 1640 і культивували до досягнення ними 75% конфлюенту. Після цього середовище замінювали на RPMI 1640, що містило 0.1% FCS, на 24 год. Кондиційоване середовище концентрували на приладі Concentrator Plus (Eppendorf, Німеччина), вимірювали концентрацію протеїну, і змішували з невідновлювальним буфером для зразків Леммлі (62,5 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 1 мМ ЕДТА, 2% ДСН, 10% гліцерин, 0.4% бромфеноловий синій). Отримані зразки зберігали при температурі -20°C . Зразки наносили на 10% ПААГ, що містив 1 мг/мл желатини (Sigma-Aldrich) з розрахунку 100 мкг протеїну на трек, і розділяли електрофоретично при максимальній напрузі 80 В. Після електрофорезу гель відмивали від ДСН розчином 2,5% Тритону X-100, після чого інкубували в реакційному буфері (50 мМ Tris-НСl, рН 8.0, 5 мМ CaCl_2 ,

1 мкМ $ZnCl_2$) протягом 24 год при 37°C. Гель фарбували 0,5% барвником Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma-Aldrich), інтенсивності світлих смуг, що відповідали активності металопротеїназ, оцінювали за допомогою програми Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics, <http://gel-pro-analyzer.software.informer.com/3.1/>).

2.2.15 Оцінювання активності лізилоксидази

Лізилоксидазну активність оцінювали в кондиційованому середовищі клітин за продукуванням H_2O_2 хемілюмінесцентним методом. Середовище інкубування містило кондиційоване середовище у перерахунку на 500 мкг протеїну, насичений киснем буфер, 10 мМ 1,5-діамінопентан, 0,1 мМ люмінол в 0,1 М натрій-боратному буфері рН 10,5, 50 одиниць пероксидази хрому. Інтенсивність хемілюмінесценції оцінювали протягом 30 хв кожні 30 сек при довжині хвилі 460 nm за допомогою приладу FLx800 («BioTek», США) [214].

2.2.16 Оцінювання вмісту і локалізації протеїнів у клітині за допомогою конфокальної мікроскопії

Клітини вирощували на покривних скельцях у повному середовищі RPMI 1640 до досягнення 65-75% конфлюенту. Скельця промивали фосфатним буфером і фіксували 4% параформальдегідом протягом 15 хв при КТ. Після цього скельця інкубували з буфером для пермеабілізації (0,5% Тритон X-100) протягом 10 хв, та блокувальним розчином (5% BSA, 0,1% Тритон X-100) протягом 30 хв при КТ. Скельця інкубували з першими моноклональними кролячими антитілами проти Е-кадгерину (Cell Signaling), моноклональними мишачими антитілами проти віментину (Sigma-Aldrich) або поліклональними кролячими антитілами проти Ki-67 (Abcam), розведеними у блокувальному розчині у співвідношенні 1:50 протягом 1 год при КТ. Після цього скельця інкубували з відповідними другими кон'югованими з барвниками Alexa Fluor 488 або Alexa Fluor 594 (Invitrogen) анти-мишачими або анти-кролячими антитілами, розведеними у блокувальному розчині у співвідношенні 1:200 протягом 45 хв в темряві при КТ. Для візуалізації актинового цитоскелету скельця інкубували з

TRITC-фалоїдином (Sigma-Aldrich) (50 мкг/мл) протягом 15 хв в темряві при КТ. Окрім цього, додатково забарвлювали ядра клітин DAPI (1 мкг/мл) протягом 15 хв в темряві при КТ. Після усіх інкубацій з антитілами чи барвниками скельця промивали тричі ЗФР. Отримані препарати монтували на предметні скельця за допомогою реактиву Mowiol 4-88 (Calbiochem Biochemicals, США).

Зображення отримували за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) та програмного забезпечення Zeiss LMN Image Browser. Наступну обробку зображень здійснювали за допомогою програми ImageJ.

2.2.17 Тест на сфероїдоутворення

Клітини висівали у 24-лунковий низькоадгезивний планшет (500 клітин/см²) у детерміноване середовище наступного складу: середовище культивування, що містить DMEM без індикатора та середовище F-12 у співвідношенні 1:1, з додаванням інсуліну (5 мкг/мл), гідрокортизону (0.5 мкг/мл), епідермального фактора росту (20 нг/мл), фактора росту фібробластів (20 нг/мл), гепарину (0,5 од/мл), добавки для культури клітин B27, бичачого сироваткового альбуміну (1%), пеніциліну (100 од/мл), стрептоміцину (100 мкг/мл). Після 7 днів культивування окремі первинні мамосфери збирали шляхом центрифугування при 1000 об/хв. і підраховували їх кількість з використанням інвертованого мікроскопа. Ефективність сфероїдоутворення визначали як відсоток загальної кількості сфероїдів до загальної кількості живих клітин, висіяних на лунку планшета. Для оцінки здатності ракових стовбурових клітин до тривалого самовідтворення *in vitro*, проводили серійне пасажування за таких же умов протягом ще трьох пасажів.

2.2.18 Дослідження резистентності клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85 до доксорубіцину

Для оцінювання хіміорезистентності клітин 4T1 використовували МТТ-тест. Вносили 10⁴ клітин кожної з досліджуваних субліній на лунку 96-

лункового планшета у 5 паралелях, культивували протягом 12 год для того, щоб клітини прикріпились, після чого додавали доксорубіцин у концентраціях 0, 0.1, 1 і 10 мкМ. Через 24 год додавали МТТ-реактив і вимірювали кількість утвореного формазану спектрофотометрично. На основі отриманого графіка виживаності клітин за різних концентрацій доксорубіцину було розраховане значення IC_{50} доксорубіцину для кожної з субліній.

2.2.19 Оцінювання трансформувального потенціалу клітин лінії 4T1 залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Трансформувальний потенціал субліній клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 здійснювали за допомогою тесту на здатність до утворення колоній в напіврідкому агарі. Клітини ($1 \cdot 10^3$) ресуспендували в 150 мкл верхнього шару агару (0,4% агар у середовищі RPMI 1640) з 0.01, 0.05, 0.1 мкМ доксорубіцину або без нього і вносили в лунки 96-лункового планшета, попередньо вкритих 100 мкл нижнього шару агару (0,8% агар у середовищі RPMI 1640), у 5 паралелях, та культивували протягом 3 тижнів. Через 3 тижні колонії фотографували при збільшенні в 40 і 200 разів та підраховували кількість колоній на лунку.

2.2.20 Визначення активності альдегіддегідрогенази

Активність альдегіддегідрогенази оцінювали в лізатах клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 (див. 2.2.3). Активність ензиму визначали за кількістю утвореного в реакції НАДН, яку оцінювали флуориметрично при довжині хвилі 600 нм. Реакційна суміш містила наступні компоненти: 100 мМ пірофосфатний буфер рН=9,0, 10 мМ гліюксаль, 0,5 мМ НАД⁺, 1 мМ ЕДТА, 0,1 мМ резозурін, 0,1 мМ феназинметасульфат (система резозурін та феназинметасульфат посилює та зсуває флуоресценцію НАДН до 600 нм, де біологічні зразки не флуоресціюють). Реакцію запускали додаванням 20 мкл лізату клітин.

2.2.21 Організація експериментів *in vivo*

При проведенні експериментів на тваринах керувались Європейською конвенцією про захист хребетних тварин від 1986 року, Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 року, та наказом Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України № 249 «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» від 1 березня 2012 року.

Для усіх експериментів використовували самок мишей лінії Balb/c віком 8 тижнів. Тварин умертвляли методом цервікальної дислокації або кардіальної перфузії, попередньо знеболивши введенням суміші кетанолу, ксилазину та ацепромазину. Для введення тваринам, клітини лінії 4T1 різних субліній культивували у повному середовищі RPMI 1640, знімали з чашок Петрі 2 мМ ЕДТА, відмивали тричі стерильним ЗФР, та ресуспендували в буфері HBSS без йонів Ca^{2+} та Mg^{2+} .

2.2.22 Оцінювання трансендотеліальної міграції клітин з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85

Клітини ендотелію капілярів легені та моноцити мишей лінії Balb/c отримували методом імуномагнітної селекції, як було описано раніше [215]. Отримані первинні ендотеліоцити легені у кількості $2,5 \cdot 10^4$ висівали на мембрану камери Бойдена з діаметром пор 8 мкм, попередньо покриту желатином та культивували до досягнення конфлюенту (приблизно 2 доби). Клітини 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 попередньо забарвлювали прижиттєвим барвником флуоресцеїном та вносили у верхню камеру у кількості $2,5 \cdot 10^4$ разом з моноцитами ($1 \cdot 10^5$) в середовищі RPMI 1640, що містило 3% FCS, а в нижню камеру додавали середовище RPMI 1640 з 10% FCS. Як контроль висівали лише клітини 4T1 WT (без моноцитів). Через 24 год мембрани відмивали і фіксували 4% параформальдегідом, після чого підраховували кількість пухлинних клітин, що промігрували через шар ендотеліоцитів.

Результати представляли у вигляді середньої кількості клітин на поле зору для щонайменше 3 незалежних експериментів.

2.2.23 Оцінювання проникності капілярів легені *in vivo*

5×10^5 клітин у 200 мкл HBSS вводили в хвостову вену миші ($n = 6$). Через 24 год тварин умертвляли, попередньо ввівши 200 мкл 0,5% барвника Evans blue за 30 хв до термінації. Перфузію проводили стерильним ЗФР, ізолювали легені, зважували їх, подрібнювали ножицями та інкубували в 1 мл формаміду протягом 4 год. при 56°C для екстракції барвника. Оптичну густина розчину вимірювали при довжині хвилі 610 нм і представляли проникність капілярів як відношення оптичної густини до маси легені.

2.2.24 Оцінювання здатності до колонізації легені *in vivo*

5×10^5 клітин у 200 мкл HBSS вводили в хвостову вену миші ($n = 6$). Через 24 год тварин умертвляли, здійснювали перфузію стерильним ЗФР, ізолювали легені, зважували їх, подрібнювали ножицями у стерильних умовах та інкубували з 1 мг/мл колагенази А протягом 1 год при 37°C . Вивільнені таким чином клітини осаджували центрифугуванням при 1500 g, відмивали тричі ЗФР, та інкубували з буфером лізису еритроцитів при 4°C протягом 5 хв. Після цього клітини ще тричі відмивали фосфатним буфером, та висівали на 6 см чашки Петрі у повному середовищі RPMI 1640, що містило 60 мкМ 6-тіогуаніну (Sigma-Aldrich). Через 2 тижні клітини фіксували 4% параформальдегідом і фарбували колонії 0,4% кристалічним фіолетовим. Фотографували чашки Петрі при збільшенні у 40 разів і підраховували кількість великих колоній (кількість клітин у яких була не менше 50).

2.2.25 Експериментальне метастазування

5×10^5 клітин у 200 мкл HBSS вводили в хвостову вену миші ($n = 5$). Через 2 тижні тварин умертвляли, здійснювали перфузію стерильним ЗФР, ізолювали легені та печінку, зважували їх та підраховували поверхневі метастази. Для того, щоб зробити легеневі метастази більш контрастними, праву долю легені

фіксували у фіксажі Буена (насичений водний розчин пікринової кислоти:40% розчин формаліну:льодяна оцтова кислота 75:25:5), після чого легені фотографували і повторно підраховували метастази. Решту органів фіксували для морфологічного аналізу та імуногістохімії.

2.2.26 Морфологічний аналіз зразків легені

Легені фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну. Фіксований матеріал перекладали у пластикові промарковані касети і проводили подальшу гістологічну обробку в автоматі Shandon (Великобританія) – дегідратація в спиртах зростаючих концентрацій (70⁰, 80⁰, 96⁰), просвітлювання у трьох послідовних розчинах ксилолу, занурювання у парафін. Виготовлення парафінових блоків здійснювали за допомогою пристрою «LAMB» (Велика Британія). Зрізи парафінових блоків отримували на ротаційному мікротомі «Leica RM2025» (Німеччина). Препарати забарвлювали гематоксиліном та еозином, аналізували за допомогою мікроскопу «Nikon» (Японія). Для мікрофотозйомки гістологічних зрізів використовували мікроскоп «Olimpus» з цифровим фотоапаратом (Японія).

Напівкількісну оцінку ефективності метастазування здійснювали за наступною схемою:

- 0 – метастази відсутні;
- + – менше 25% тканини заміщені метастазами;
- ++ – 25-50% тканини заміщені метастазами;
- +++ – 50-75% тканини заміщені метастазами;
- ++++ – більше 75% тканини заміщені метастазами.

2.2.27 Імуногістохімічне оцінювання вмісту антигена проліферації Ki-67 у клітинах, що метастазували в легені

Для імуногістохімії антигена проліферації Ki-67 парафінові зрізи товщиною 5 мкм депарафінізували в ксилолі та дегідрували в градуйованій серії розчинів етанолу. Ендогенну активність пероксидази та неспецифічне

зв'язування блокували 0,3% перекисом водню в метанолі протягом 30 хв. Після промивання ЗФР, додавали 10% FCS на 20 хв для блокування неспецифічної реакції. Далі зрізи інкубували з першими кролячими поліклональними антитілами проти Ki-67 (Abcam), розбавленими у блокувальному розчині у співвідношенні 1: 200 протягом 14-16 год при 4°C. Другі ко'юговані з пероксидазою хрому козячі антикролячі антитіла розбавляли у блокувальному розчині у співвідношенні 1:100 та інкубували з ними зрізи протягом 60 хв при КТ. Пероксидазну реакцію візуалізували шляхом інкубування зрізів з 0,02% ДАБ (3,3'-диамінобензидинтетрагідрохлоридом) з додаванням перекису водню (кінцева концентрація 0,01%). Додатково секції фарбували метиленовим синім (Merck, Німеччина). Клітини вважалися Ki-67-позитивними, коли імунореактивність була чітко виявлена в їхніх ядрах. Вміст Ki-67 представляли як співвідношення Ki-67-позитивних клітин до загальної кількості клітин.

2.2.28 Статистична обробка результатів

Статистичну обробку проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica (StatSoft, <http://www.statsoft.com/Products/STATISTICA-Features>). Всі результати описані у вигляді середнього значення та стандартної похибки. Для аналізу кількісних значень ми використовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) для незв'язаних вибірок з поправкою Бонфероні для множинних порівнянь. Попарні порівняння здійснювали за допомогою двовибіркового t-тесту Ст'юдента для незалежних вибірок з нерівними дисперсіями. Для порівняння значень, отриманих напівкількісними методами (морфологічна оцінка кількості метастазів, оцінка імуноблотів), використовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Різницю між групами вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Отримання субліній клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та пригніченою експресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85

З метою створення моделі для дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі злоякісної трансформації та метастазування було обрано клітинну лінію 4T1 (ATCC CRL-2539). Це високоінвазивні клітини аденокарциноми грудної залози миші, які використовуються для відтворення тваринної моделі раку грудної залози людини на IV стадії. Важливими перевагами клітин лінії 4T1 є простота культивування, їх здатність до спонтанного формування метастазів у легені, печінку, мозок, лімфовузли при перевиванні мишам лінії Balb/c, що не потребує видалення первинної пухлини, а також резистентність до 6-тіогваніну, що дозволяє ідентифікувати навіть поодинокі пухлинні клітини [216].

Сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 з надекспресією адаптерного протеїну Ruk/CIN85, названі RukUp-1 та RukUp-2, були отримані шляхом кальцій-фосфатної трансфекції клітин 4T1 WT плазмідною pRc/CMV2-Ruk1 з подальшою селекцією за присутності селективного антибіотика та субклонування. Відповідну контрольну сублінію, названу Mock, було отримано шляхом кальцій-фосфатної трансфекції клітин 4T1 WT плазмідною pRc без вставки з подальшою селекцією за присутності селективного антибіотика G418. Для отримання сублінії з пригніченням експресії Ruk/CIN85 (RukDown) та відповідної контрольної сублінії (Scr), клітини 4T1 WT інфікували лентівірусом pLKO.1-shRuk/CIN85 R22, що містив специфічну до Ruk/CIN85 послідовність, або ж вірусом, що кодує shRNA, не специфічну до жодної послідовності геному ссавців. Отримані інфектанти піддавали селекції за присутності селективного антибіотика пуроміцину та субклонували. Як додатковий контроль в серії експериментів використовували також вихідні клітини 4T1 WT.

Вміст адаптерного протеїну Ruk/CIN85 та рівень експресії його мРНК в отриманих сублініях оцінювали Вестерн-блотом та кількісною ПЛР. Морфологію клітин оцінювали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Для Вестерн-блот аналізу використовували поліклональні кролячі антитіла проти SH3A домену Ruk/CIN85, які дозволяють виявити повнорозмірну форму Ruk/CIN85 та мишачі моноклональні антитіла проти β -актину для нормалізації кількості протеїну, внесеного у лунки ПААГ. Для кількісної ПЛР використовували праймери, що ампліфікують частину екзона 1 мРНК Ruk/CIN85 миші, а також праймери до мРНК ензиму гліколізу GAPDH як референтного гена. На рис. 3.1, А, Б видно, що як вміст повнорозмірної форми адаптерного протеїну Ruk/CIN85, так і експресія мРНК цього адаптера у контрольних сублініях Mock та Scr не відрізнялись від вихідних клітин 4T1 WT. Достовірно вищий вміст та експресія мРНК Ruk/CIN85 спостерігались в сублініях RukUp-1 та RukUp-2 порівняно з контрольною сублінією Mock, і, навпаки, достовірне зниження вмісту та експресії Ruk/CIN85 в сублінії RukDown у порівнянні зі Scr.

Зміни в рівні експресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зумовили відмінності в морфології окремих субліній. За даними фазово-контрастної мікроскопії, всі контрольні клітинні лінії (WT, Mock і Scr) характеризувались подібним змішаним епітелійно-мезенхімним фенотипом, що узгоджується з попередніми публікаціями [138]. У той же час, культура клітин 4T1 з підвищеною експресією Ruk/CIN85 виявилась гетерогенною за фенотипом і включала клітини як з округлою (70-80%), так і подовженою мезенхімною (20-30%) морфологією. На відміну від цього, клітини RukDown набули більш вираженого епітелійного фенотипу, представленого клітинним шаром, подібним до бруківки, зі щільними міжклітинними контактами, характерними для нормальних епітелійних клітин грудної залози. Згідно з сучасними уявленнями, округлення клітин є типовою передумовою для набуття високоефективного амебоїдного типу міграції, пов'язаного з агресивним інвазивним потенціалом та схильністю до метастазування [166].

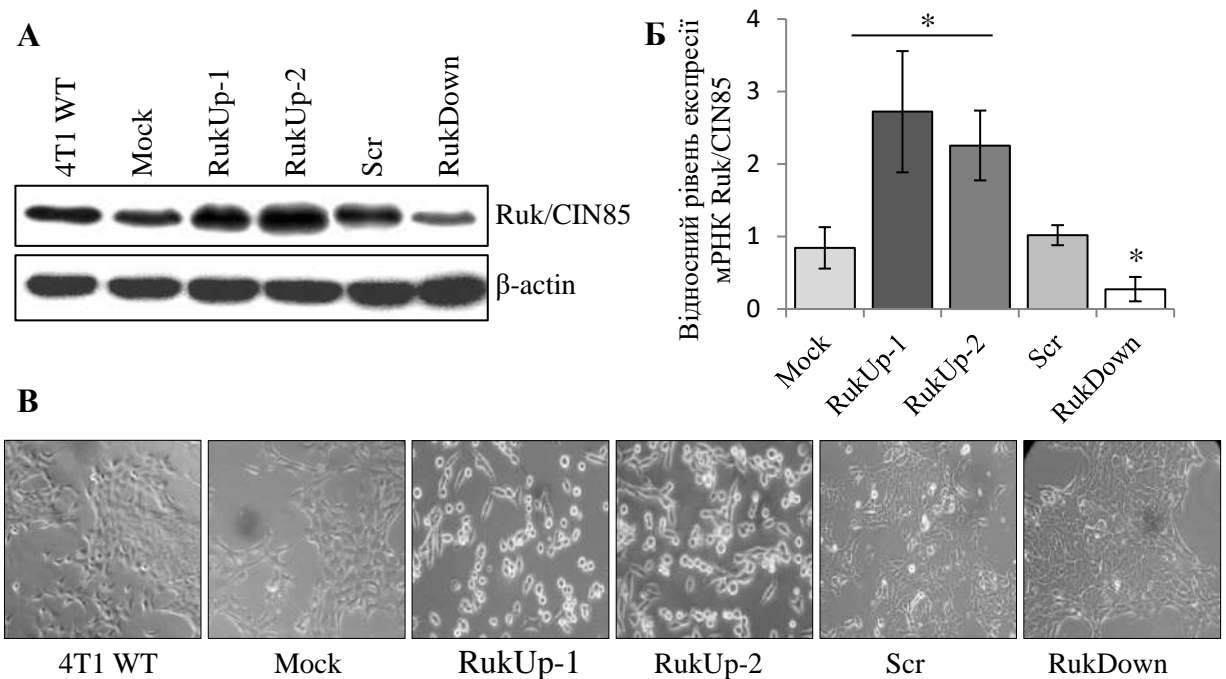


Рис. 3.1 Вміст та рівень експресії мРНК адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в отриманих сублініях клітин 4T1. А – Вестерн-блот аналіз, β -актин був використаний для нормалізації. Б – Відносний рівень експресії мРНК Ruk/CIN85. Значення експресії мРНК Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 WT було прийнято за 1, значення для решти субліній нормалізовано відносно 4T1 WT. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n = 4$. В – Фотографії субліній клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85, зроблені за допомогою інвертованого мікроскопа Olympus при збільшенні у 100 разів

3.2 Характеристика асоційованих з ЕМТ особливостей поведінки клітин 4T1 (проліферативний потенціал, адгезивність, здатність до міграції й інвазії *in vitro*) залежно від рівня експресії Ruk/CIN85 в отриманих сублініях

З даних літератури відомо, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 бере участь у регулюванні сигналювання, залежного від EGFR, PI3K, які контролюють ріст та проліферацію клітин [59, 60]. Проліферативну активність субліній клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85 оцінювали шляхом побудови кривих росту на основі прямого підрахунку клітин, а

також МТТ-тесту. За результатами обох підходів було продемонстровано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 призводила до зниження як проліферативного потенціалу, так і активності мітохондріальних дегідрогеназ, тоді як внаслідок пригнічення експресії Ruk/CIN85 проліферативна активність клітин 4T1, навпаки, зростала (рис. 3.2, А, Б). Додатково аналізували вміст ядерного антигена проліферації Ki67 (Рис. 3.2, В, Г). Встановлено, що при пригніченні експресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 достовірно зростає відсоток Ki67-позитивних клітин у культурі, тоді як при надекспресії Ruk/CIN85 кількість Ki67-позитивних клітин, навпаки, знижується.

Клітинна адгезія до позаклітинного матриксу є фундаментальною структурно-функціональною необхідністю для метастазування ракових клітин за мезенхімним типом, тоді як міграція й інвазія за амебоїдним типом переважно не залежить від адгезії [217]. Відомо, що Ruk/CIN85 може бути залучений до контролю адгезивності клітини, шляхом його взаємодії з компонентами комплексу фокальної адгезії – кіназами FAK і Ruk2, та AIP1/Alix [85]. Для оцінки ефекту адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на адгезивність клітин лінії 4T1, клітини різних субліній висівали у лунки 96-лункового планшета, вкриті Матригелем, колагеном 1 типу або фібронектином. Через 30 хв неприкріплені клітини відмивали ЗФР і зафарбовували ті, які прикріпились. Було встановлено, що клітини з надекспресією Ruk/CIN85 мають нижчі показники адгезивності до колагену 1 типу і фібронектину у порівнянні з контрольною сублінією Моск, проте їх адгезивність до Матригелю не змінюється. Пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 супроводжувалась достовірним зростанням їх адгезивності до усіх трьох досліджуваних компонентів позаклітинного матриксу у порівнянні з контрольною сублінією Scr. Таким чином, отримані результати свідчать про негативний зв'язок між вмістом Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 та їх адгезивними властивостями (рис. 3.3).

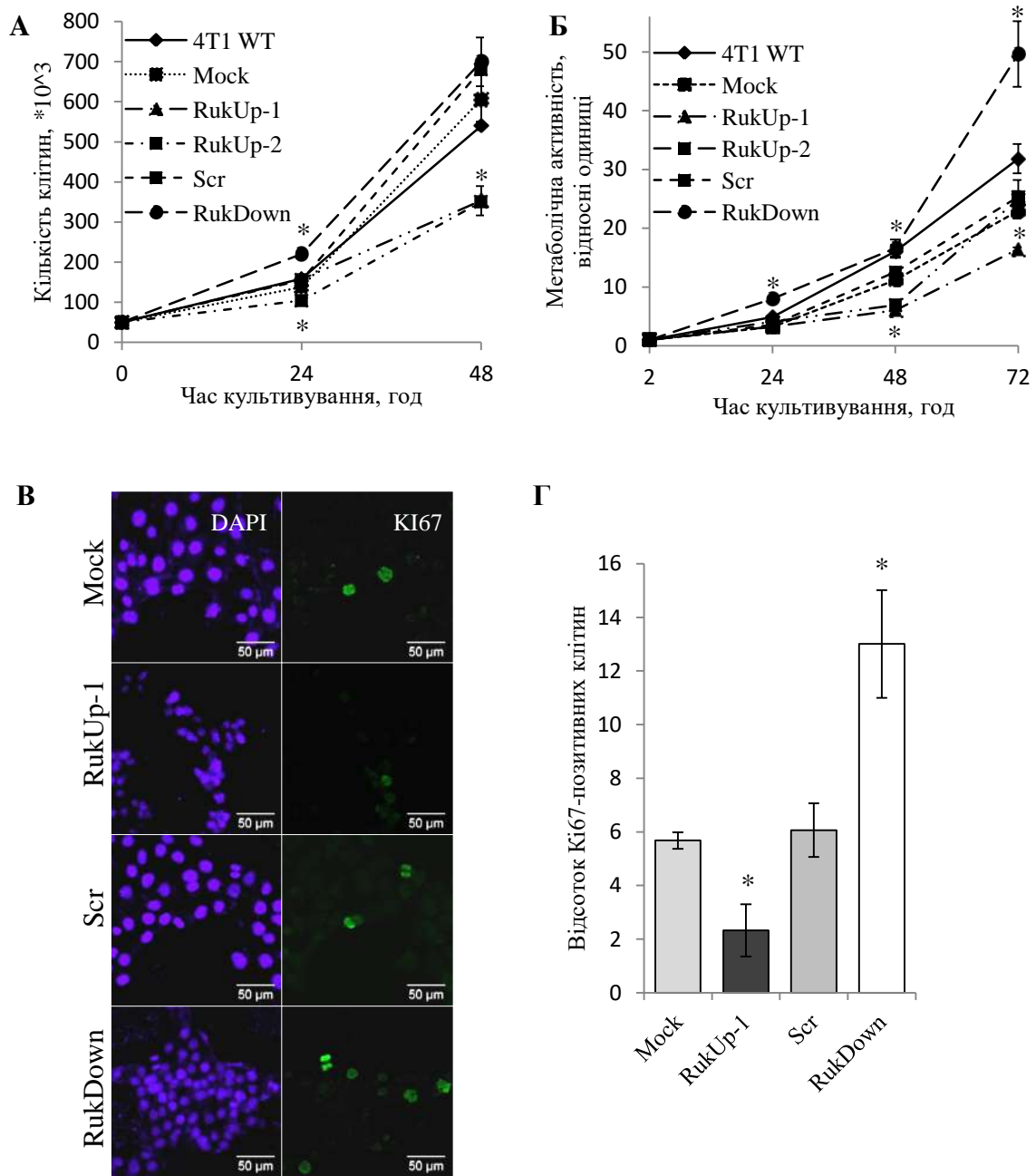


Рис. 3.2 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює проліферативну активність клітин 4Т1. А – криві росту клітин субклонів 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85, побудовані на основі прямого підрахунку кількості живих клітин. Б – Результати МТТ-тесту. В – флуоресцентне імунобарвлення проліферативного антигену Кі67 у клітинах субклонів 4Т1. Г – відсоток Кі67-позитивних клітин у досліджуваних сублініях. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

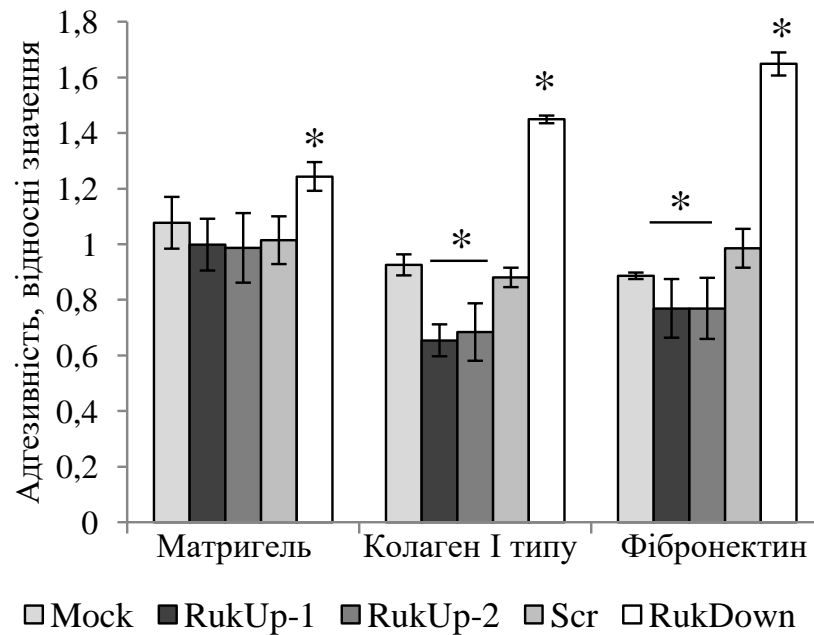


Рис. 3.3 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює адгезивність клітин лінії 4T1 до Матригелю, колагену 1 типу та фібронектину. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

Рухливість клітин 4T1 різних субліній досліджували за допомогою тесту на заростання подряпини. Для цього клітини висівали у чашки Петрі і культивували у безсироватковому середовищі з подальшою інкубацією з мітоміцином С (щоб мінімізувати ефект проліферації клітин на швидкість міграції) до досягнення ними 90% конфлюенту, після чого робили подряпину наконечником на 200 мкл. Подряпину фотографували одразу після створення, і через 24 год (в тому ж місці), після чого розраховували коефіцієнт міграції M за формулою:

$M = (W_0 - W_{24}) / W_0$, де W_0 і W_{24} – ширина подряпини на початку експерименту і через 24 год., відповідно. Таким чином, коефіцієнт міграції відображає частку від вихідної ширини подряпини, яку клітини промігрували за 24 години.

Було продемонстровано, що клітини субліній з надекспресією Ruk/CIN85 (RukUp-1 і RukUp-2) характеризуються достовірно вищим міграційним потенціалом, аніж контрольні клітини сублінії Mock. Також, показано, що рухливість клітин сублінії RukDown достовірно нижча, аніж контрольної сублінії Scr (рис. 3.4).

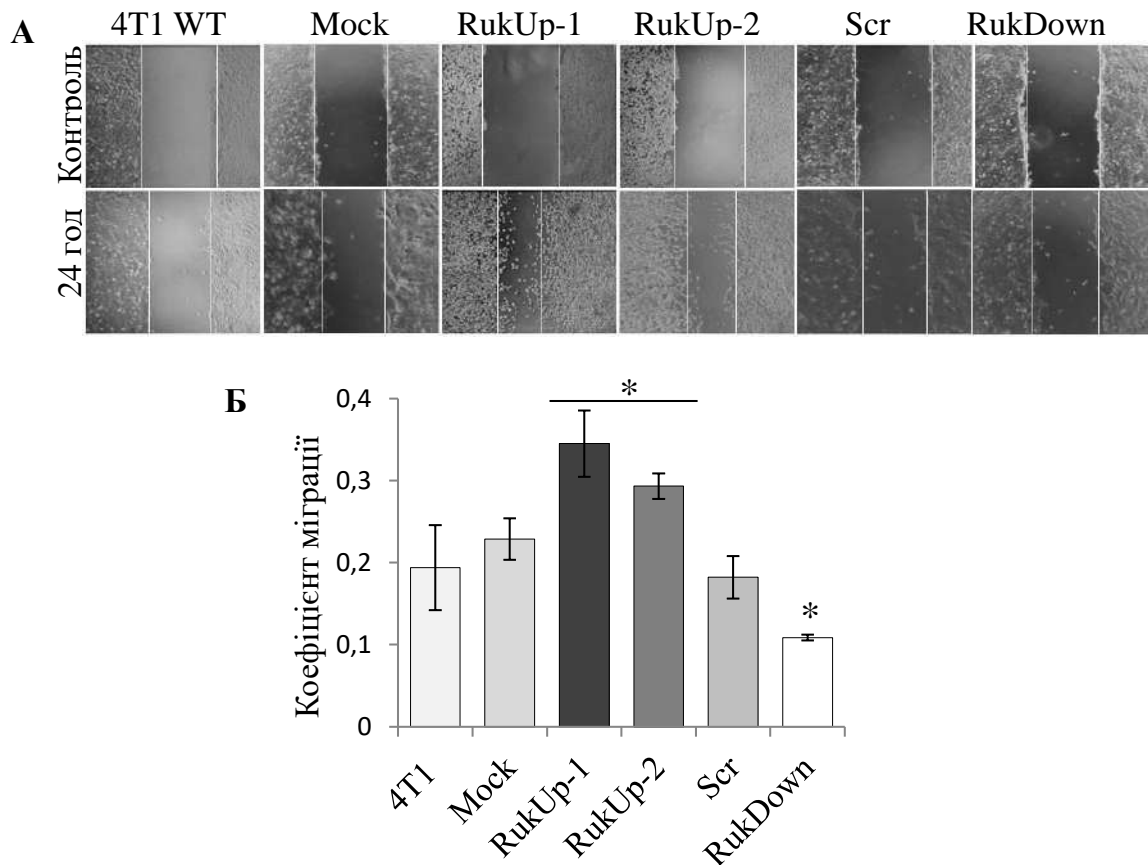


Рис. 3.4 Вплив адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на рухливість клітин лінії 4T1. А – репрезентативні зображення подряпини на момент її створення та через 24 год; Б – значення коефіцієнта міграції для субліній клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

Для з'ясування ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі інвазивності клітин лінії 4T1, використовували тест на інвазію у модифікованій камері Бойдена. Ця камера містить напівпроникну мембрану з діаметром пор 8 мкм, вкриту позаклітинним матриксом, а саме Матригелем, фібронектином чи колагеном I типу. Протягом 24 год пухлинні клітини мігрують через таку мембрану, після чого їх фіксують та фарбують кристалічним фіолетовим ті клітини, які промігрували і опинились на внутрішній стороні вставки. Було показано, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зростала їх здатність до інвазії через Матригель, фібронектин та колаген I типу, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 супроводжувалось значним і достовірним зниженням інвазивності клітин 4T1 через усі три матрикси у порівнянні з контролем (рис. 3.5).

Цікаво відзначити, що зазначені особливості інвазії клітин RukUp через різні молекули ЕСМ обернено корелюють з їх адгезивними властивостями (див. рис. 3.3).

Таким чином, одержані результати свідчать про те, що клітини з вищим вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 характеризуються посиленою рухливістю та інвазивністю, а отже, потенційно можуть мати вищий метастатичний потенціал.

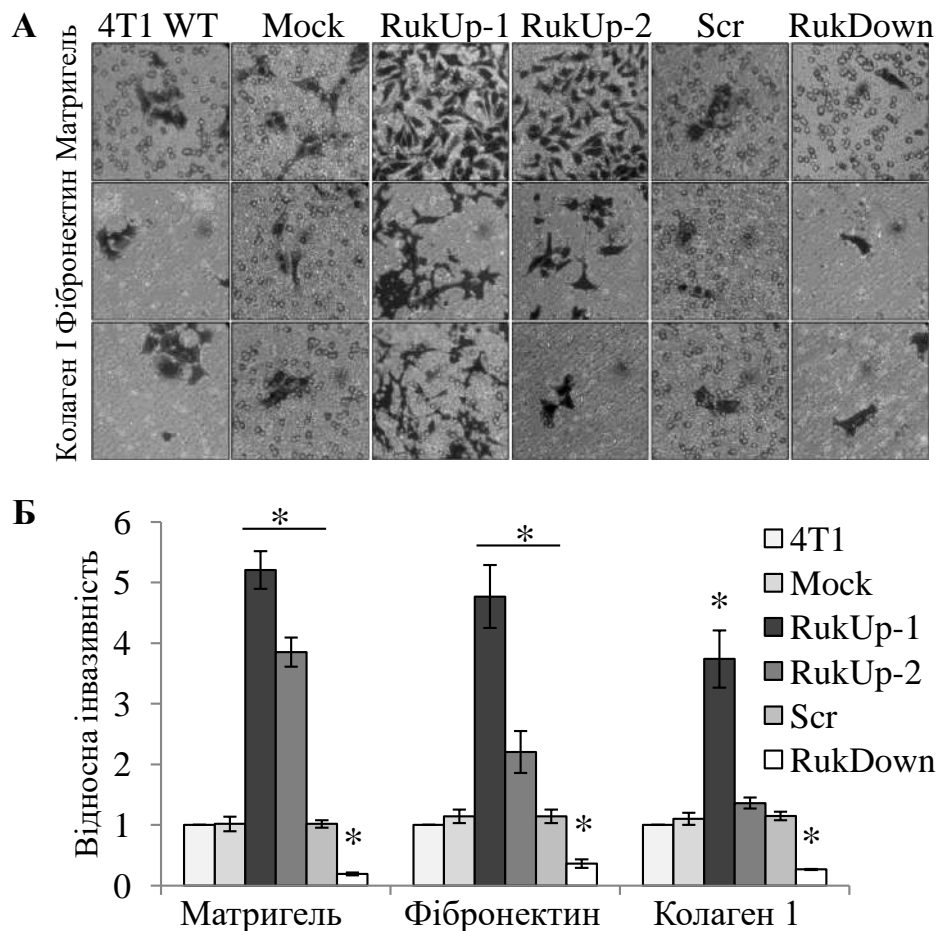


Рис. 3.5 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює інвазивність клітин 4T1 у концентраційно-залежний спосіб. А – репрезентативні зображення клітин, що промігрували через мембрану, вкриту Матригелем, фібронектином чи колагеном I типу; Б – значення інвазивності для субліній клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

Одним із зв'язувальних партнерів Ruk/CIN85 є нерецепторна тирозинкіназа Src, у комплексі з якою Ruk/CIN85 модулює адгезивність і

чутливість пухлинних клітин до апоптозу [61, 74, 85, 94]. Для перевірки гіпотези про те, чи залежить посилена Ruk/CIN85-індукована рухливість клітин 4T1 від активації Src, ми оцінювали рівень активності цієї кінази за вмістом її фосфорильованої форми, а також вплив інгібітора Src PP2 на рухливість клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. Було встановлено, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 значно (більш ніж у 10 разів) зростає вміст активної автофосфорильованої за залишком Y416 форми Src-кінази (рис. 3.6, А, Б), тоді як застосування інгібітора PP2 достовірно пригнічує рухливість контрольних клітин удвічі, а клітин з надекспресією Ruk/CIN85 - у 4 рази (рис. 3.6, В). Варто зазначити, що раніше на моделі клітин лінії MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 було продемонстровано, що застосування інгібітора Src пригнічує активацію кінази Akt [8], що свідчить про важливу роль осі Src/Akt у контролі міграції пухлинних клітин.

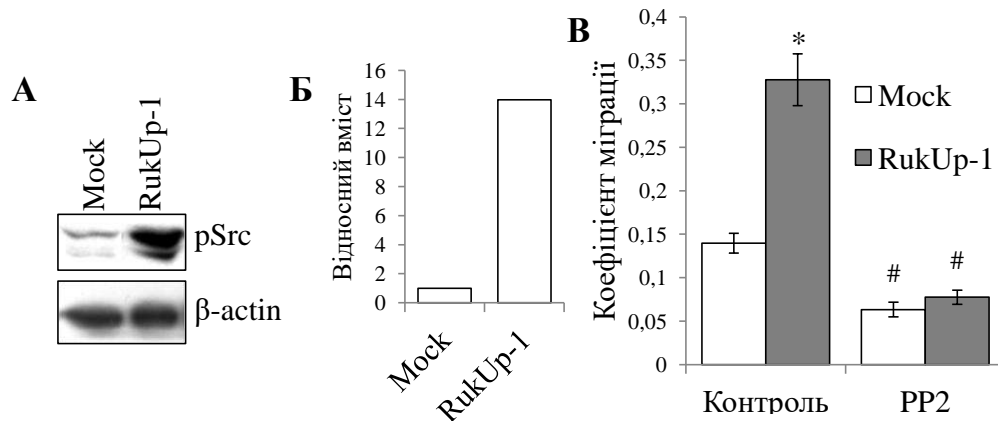


Рис. 3.6 Посилення міграції клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 може реалізуватись через активацію кінази Src. А, Б – вміст активної pSrc (А – Вестер-блот аналіз, Б – денситометричний аналіз блотограми, для нормалізації використовували β-актин, В – вплив інгібітора кінази Src PP2 на рухливість клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. * - $p < 0,05$ відносно сублінії Mock, # - $p < 0,05$ відносно відповідних нестимульованих клітин, $n=4$

Беручи до уваги одержані нами дані про те, що надекспресія Ruk/CIN85 веде до зростання їх рухливості та інвазивності, на наступному етапі було досліджено динаміку міграції та інвазії клітин сублінії RukUp-1 через Матригель

за допомогою приладу xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (RTCA) DP Instrument, оснащеного платою CIM-plate 16. Цей прилад дає можливість оцінювати міграцію та інвазію клітин (клітинний індекс) через мембрану плати залежно від зміни опору мембрани в реальному часі. Для оцінки інвазії ми використовували плати CIM-plate 16 з мембраною, вкритою Матригелем, а для тестів на міграцію не використовували жодного покриття. Окрім цього, було використано негативний контроль SF(без сироватки, serum free): у цьому випадку у нижню камеру не додавали атрактанта (FCS).

Динаміку рухливості клітин 4T1 субліній RukUp-1 та Mock здійснювали протягом 24 год, вимірюючи значення клітинного індексу кожні 10-15 хв. Приблизно через 1 год для усіх досліджуваних зразків спостерігали незначне зростання клітинного індексу, яке відповідало прикріпленню клітин до мембрани плати. Через 12 год. починалось зростання клітинного індексу клітин сублінії RukUp-1, а через 16 год. – і клітин сублінії Mock. Максимальні значення клітинного індексу для клітин Mock не перевищували 0,25 од., тоді як для сублінії RukUp-1 – сягали 2,5 од., що свідчить про значно інтенсивнішу міграцію клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 (рис. 3.7, А). Статистичний аналіз значень клітинного індексу для досліджуваних субліній здійснювали на 12, 16, 20 і 24 год. При цьому було показано, що у кожній з обраних часових точок рухливість клітин сублінії RukUp-1 була достовірно вищою у порівнянні з контрольними клітинами Mock (рис. 3.7, Б).

Ефективність інвазії через Матригель оцінювали протягом 72 год з кроком у 10-15 хв. Як і у випадку з тестами на рухливість, через годину фіксували пік клітинного індексу, що відповідав прикріпленню клітин, а вже через 12 годин – старт інвазії. Для обох досліджуваних субліній спостерігали доволі плавне зростання клітинного індексу в часі з виходом на плато приблизно через 48 год. Максимальні значення клітинного індексу для сублінії Mock становили 1,2 од., а для клітин сублінії RukUp-1 були значно вищими і досягали 4,5 (рис. 3.8, А). Для статистичного аналізу було обрано часові точки 12, 24, 36, 48, 60 та 72 год. На 12 та 24 год статистично достовірних відмінностей у значеннях клітинного індексу

для субліній RukUp-1 та Mock виявлено не було, проте починаючи з 36 год і до кінця експерименту, значення клітинного індексу для сублінії RukUp-1 були достовірно вищими, аніж для сублінії Mock (рис. 3.8, Б).

Таким чином, отримані нами результати демонструють, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у аденокарциномних клітинах лінії 4T1 веде до значного зростання інтенсивності міграції через напівпроникну мембрану та інвазії через шар Матригелю. В той же час, аналіз кривих міграції та інвазії показав, що час початку інвазії/міграції та виходу на плато не залежить від вмісту Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 [218].

Результати експериментальних досліджень, представлені у даному розділі дисертаційної роботи, засвідчили, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується зниженням їх проліферативного потенціалу та адгезивності, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85, навпаки, веде до посилення проліферації і адгезії. На моделі клітин аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 було одержано подібні результати: клітини MCF-7 з надекспресією Ruk/CIN85 проліферують повільніше, аніж контрольні клітини, а також зростає кількість живих неприкріплених клітин у культурі, що свідчить про їх знижену адгезивність [218]. Відомо, що взаємодія Ruk/CIN85 з AIP1/Alix пригнічує формування комплексу фокальної адгезії [85], і, таким чином, може знижувати адгезивність клітин. За даними літератури, низька адгезивність пухлинних клітин може бути ознакою «швидкого» амебоїдного типу міграції цих клітини, на відміну від «повільного» мезенхімного [219]. Окрім цього, було показано, що низькоадгезивні клітини раку грудної залози та товстої кишки характеризуються високою туморогенністю, підвищеними рівнями експресії маркерів ЕМП та проявляють ознаки ракових стовбурових клітин [220].

Також, з даних літератури відомо, що пухлинні клітини різного походження, зокрема гліоми [221], меланоми [222], карциноми товстої кишки [223], грудної залози [224] можуть перебувати у стані рівноваги між двома

альтернативними станами – проліферативним та інвазивним. Гіпотеза про дихотомію між цими двома стратегіями поведінки пухлинних клітин була також підтверджена за допомогою методів біоінформатики [225, 226]. Ймовірно, надекспресія Ruk/CIN85 «перемикає» клітини лінії 4T1 з проліферативного стану в інвазивний, тоді як клітини з пригніченою експресією Ruk/CIN85 перебувають у проліферативному низькоінвазивному стані.

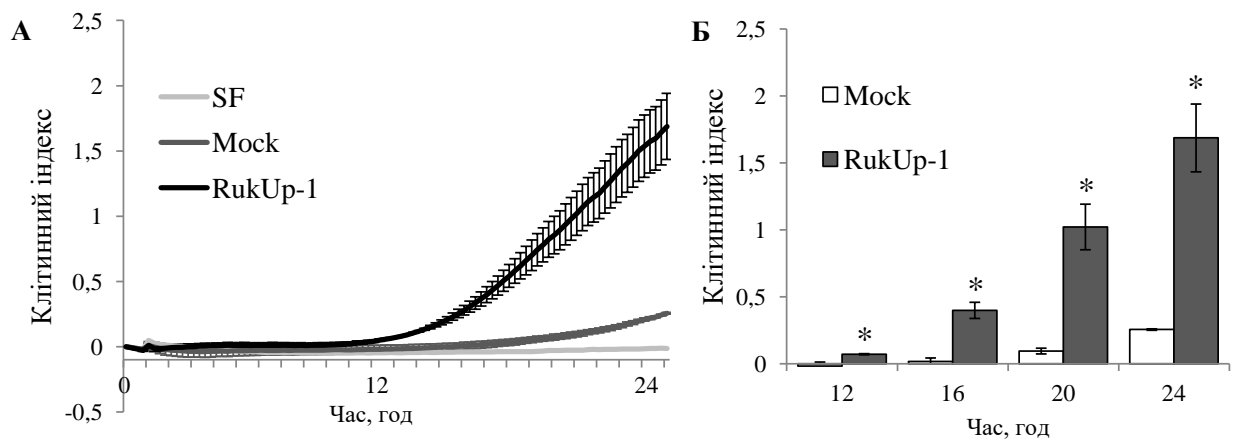


Рис. 3.7 Динаміка міграції клітин 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. А – Криві міграції, Б – Статистичний аналіз міграційної активності на 12, 16, 20 і 24 год, * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною сублінією Mock, $n=3$

Окрім зниженого проліферативного потенціалу та адгезивності, клітини лінії 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються підвищеною рухливістю та інвазивністю, а пригнічення експресії Ruk/CIN85, навпаки, веде до втрати цих властивостей. Отримані нами результати узгоджуються з даними, отриманими на інших моделях. Так, при надекспресії повнорозмірної форми Ruk/CIN85 у клітинах раку грудної залози людини лінії MCF-7 підвищується рухливість цих клітин. Одночасно, вони стають меншою мірою залежні від дії EGF, аніж контрольні клітини [8]. На іншій моделі раку грудної залози людини, клітинній лінії MDA-MB-231, показано,

що пригнічення експресії Ruk/CIN85 за допомогою специфічних інтерферуючих РНК, навпаки, супроводжується зниженням як рухливості, так і інвазивності через Матригель [99, 227]. Зв'язувальними партнерами адаптерного протеїну Ruk/CIN85 є компоненти інвадоподій – спеціалізованих випинань плазматичної мембрани клітини, збагачені на актин, які беруть участь в інвазії та метастазуванні пухлинних клітин. Показано, що взаємодія Ruk/CIN85 з ASAP1/AMAP1 є необхідною для інвазивності клітин раку грудної залози людини лінії MDA-MB-231 [99]. Аналіз зв'язувальних партнерів SH3 доменів Ruk/CIN85 виявив і інші компоненти інвадоподій, з якими може взаємодіяти Ruk/CIN85 – це N-WASP, WIP, Tks4 і Dynamin 2 [61, 72]. Припускається, що Ruk/CIN85 може контролювати рухливість та інвазивність шляхом регулювання динаміки актинового цитоскелету за рахунок взаємодії з F-актином [70] та актин-зв'язувальними протеїнами p130Cas [63], кортактином [88] і CAPZ [89].

За результатами наших досліджень, одним із ключових механізмів, який може забезпечувати значне посилення міграційної активності та інвазивного потенціалу клітин 4T1 RukUp-1, є високий рівень активності кінази Src. Надекспресію Src виявлено в пухлинах різного тканинного походження, таких як гепатоцелюлярна карцинома, карцинома підшлункової залози, шлунка, стравоходу, грудної залози, яєчників, легені [228]. Src контролює проліферацію, адгезію, інвазію і рухливість клітин шляхом фосфорилування і, як наслідок, модулювання активності великої кількості субстратів, включаючи ключові компоненти комплексу фокальної адгезії (вінкулін, кортактин, таллін, паксилін, FAK, тензин, езрин і p130Cas), протеїни клітинних контактів (β - і γ -катенін, ZO-1, окклюдин, катенін p120, коннексин 43, нектин-2), ензими, що беруть участь у метаболізмі фосфоліпідів, (PLC- γ , субодиниця p85 PI3-кінази) і сигнальні молекули (p190RhoGAP, p120RasGAP Eps8) [229]. Експериментальні дані свідчать, що використання інгібітора Src PP2 пригнічує рухливість, інвазивність та ЕМТ у потрійно-негативних клітинах раку грудної залози [230].

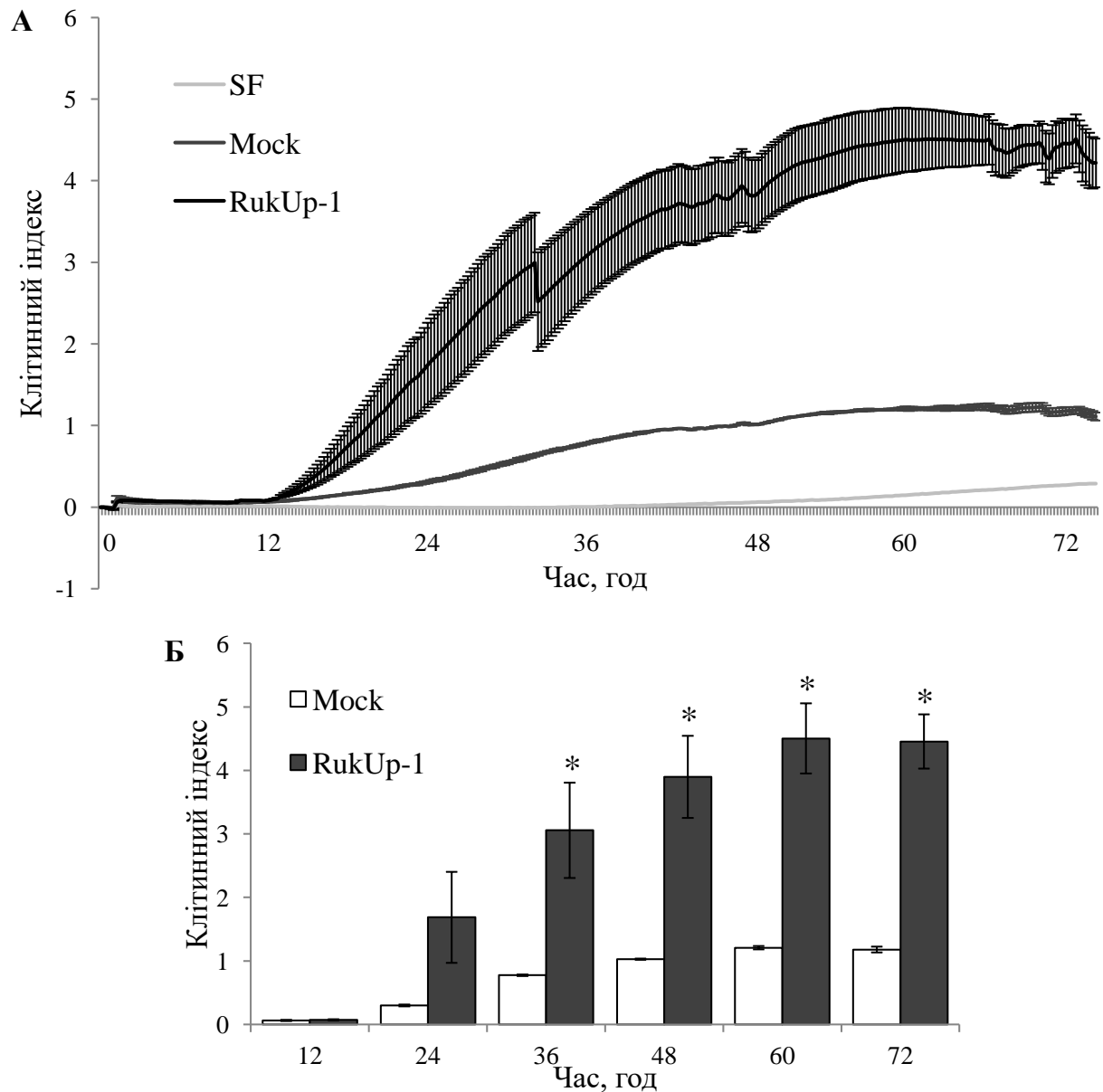


Рис. 3.8 Динаміка інвазії через Матригель клітин 4Т1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. А – Криві інвазії, Б – Статистичний аналіз міграційної активності на 12, 24, 36, 48, 60 і 72 год, * - $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною сублінією Mock, $n=3$

3.3 Аналіз рівнів експресії генів, залучених до контролю EMT в клітинах 4Т1, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 методами кількісної RT-PCR, імунофлуоресцентної мікроскопії та Вестерн-блот аналізу

Інвазія і метастазування пухлинної клітини супроводжуються епітелійно-мезенхімним переходом (EMT), для якого властиві пригнічення експресії

«епітелійних» генів – тих, які забезпечують апікально-базальну полярність, міжклітинні контакти тощо, і індукція експресії «мезенхімних» генів, відповідальних за зміну форми клітини, підвищення рухливості та здатності до деградації елементів позаклітинного матриксу [151]. Одними з основних маркерів ЕМТ є втрата епітелійного протеїну Е-кадгерину, який є компонентом міжклітинних контактів епітелію, та зростання вмісту віментину - протеїну проміжних філаментів мезенхімних клітин. Ці маркери були обрані для первинного аналізу ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у розвитку ЕМТ у аденокарциномних клітинах лінії 4Т1. Вестерн-блот аналіз з використанням антитіл проти віментину, Е-кадгерину і β -актину як протеїну для нормалізації (рис. 3.9, А) показав, що сублінії клітин 4Т1 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються зростанням вмісту віментину та зниженням вмісту Е-кадгерину, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 вело до посилення експресії епітелійного маркера Е-кадгерину і втрати мезенхімного протеїну віментину. Експресію мРНК генів віментину *Vim* та Е-кадгерину *Cdh1* оцінювали за допомогою ПЛР в реальному часі з використанням *Gapdh* як референтного гена. Було встановлено, що рівень експресії віментину достовірно зростає у клітинах 4Т1 з надекспресією Ruk/CIN85 в 11 разів у порівнянні з контролем, а за умов пригнічення цього адаптера – знижується удвічі. Для Е-кадгерину було продемонстровано зворотну залежність: його рівень експресії у сублінії RukUp-1 знижувався у 5 разів (рис. 3.9, Б). Результати імуофлуоресцентного барвлення клітин 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85 (рис. 3.9, В) загалом узгоджуються із даними ПЛР в реальному часі і Вестерн-блот аналізу. Було показано, що інтенсивність сигналу для Е-кадгерину була відносно низькою в контрольних клітинах Mock і Scr, тоді як відповідний сигнал в клітинах RukUp-1 за умов експерименту виявити не вдалось. Встановлено, що Е-кадгерин локалізується в ділянках міжклітинних контактів у клітинах RukDown з вираженим епітелійним фенотипом, що відображено посиленням барвлення мембрани. Висока інтенсивність барвлення на віментин була характерною для клітин RukUp-1 зі змішаним амебоїдно-мезенхімним

фенотипом, особливо в ділянках подовження клітин. Крім того, невеликі за розміром поліморфні ядра клітин RukUp-1 були ще одним доказом їх амебоїдної природи [125, 166, 174].

Культура клітин, як і пухлина, є гетерогенним системним утворенням і складається з різних за своїми властивостями субпопуляцій. Для того, щоб перевірити гіпотезу про те, що вища інвазивність пухлинних клітин корелює із вищим вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85, було одержано дві високоінвазивні субпопуляції клітин 4T1. Для цього клітини 4T1 WT, які проінвазували через шар Матригелю у камері Бойдена, відкріплювали від мембрани розчином ЕДТА з наступним пропагуванням у культурі. Так було отримано сублінію M1. На основі неї таким же чином отримали високоінвазивну сублінію клітин 4T1 M2. За результатами Вестерн-блот аналізу, обидві високоінвазивні сублінії, M1 та M2, характеризувались вищим вмістом Ruk/CIN85 у порівнянні з вихідними клітинами. Зниження в клітинах M1 та M2 вмісту Е-кадгерину та зростання вмісту віментину свідчить про більш виражений ЕМТ, аніж у загальній популяції клітин 4T1 (рис. 3.10). Такі результати доводять, що між рівнем експресії Ruk/CIN85 та ЕМТ є регуляторна взаємозалежність: адже, з одного боку, надекспресія Ruk/CIN85 супроводжується посиленням ЕМТ, а з іншого – пухлинні клітини з підвищеною інвазивністю та ознаками ЕМТ характеризуються вищим вмістом Ruk/CIN85.

Таким чином, за допомогою експериментальних підходів, нами було продемонстровано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується зростанням рівня експресії та вмісту віментину і пригніченням Е-кадгерину. І, навпаки, down-регулювання Ruk/CIN85 веде до зростання вмісту Е-кадгерину і пригнічення віментину. Також, було одержано субпопуляцію клітин лінії 4T1, які характеризуються підвищеною інвазивністю через Матригель, що корелює з вираженістю молекулярних ознак ЕМТ і вищим вмістом Ruk/CIN85. Віментин – це протеїн проміжних філаментів класу III, виявлений в мезенхімних клітинах різного походження. З даних літератури відомо, що віментин бере участь у дозріванні комплексу фокальної адгезії,

регулює організацію цитоскелету, і в такий спосіб контролює форму клітини, адгезивність, стимулює рухливість пухлинних клітин *in vitro* [231, 232]. На зразках первинних пухлин грудної залози людини було продемонстровано, що високий рівень експресії віментину спостерігається у більш ніж 50% випадків карциноми грудної залози, корелюючи з пізніми стадіями розвитку пухлини, наявністю метастазів у лімфовузлах, HER2+ статусом, рецидивами захворювання та метастазами [233]. Для випадків тричі негативного раку грудної залози (triple-negative breast cancer, TNBC), високий рівень експресії віментину асоційований з високим ядерним показником (nuclear grade) і, відповідно, низьким рівнем диференціювання, високим рівнем експресії Кі67 та поганим прогнозом для пацієнта, особливо стосовно виживаності без рецидивів та загальної виживаності [234]. Е-кадгерин – це молекула клітинної адгезії, яка забезпечує формування міжклітинних контактів і є характерною для диференційованих епітелійних клітин. Високий рівень експресії Е-кадгерину асоційований з відсутністю метастазів у лімфовузлах і дистантних метастазів, тоді як пригнічення чи втрата експресії Е-кадгерину є ознакою агресивних пухлин і супроводжується посиленням інвазивності, наявністю метастазів у лімфовузлах і дистантних органах [235-237]. Отже, одержані результати свідчать про те, що підвищений рівень експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 може стимулювати ЕМТ у клітинах раку грудної залози.

Зважаючи на зв'язок між рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 та вмістом основних маркерів ЕМТ віментину та Е-кадгерину, на наступному етапі було проаналізовано рівні експресії мРНК низки генів, залучених до регулювання ЕМТ. Серед класичних індукторів ЕМТ виділяють низку ТФ (так званих ключових регуляторів ЕМТ, від англ. “master regulators of EMT”), які індукують експресію мезенхімних маркерів та пригнічують експресію епітелійних маркерів. До них належать, наприклад, Zeb1, Zeb2, Snail, Twist1. Було продемонстровано, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зростають рівні експресії вказаних ТФ, тоді як пригнічення Ruk/CIN85 веде до зниження рівнів експресії цих ТФ. Було проаналізовано також

рівні експресії ТФ Klf17 та Myb і встановлено негативну залежність між вмістом Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 і рівнями експресії цих ТФ (рис. 3.11).

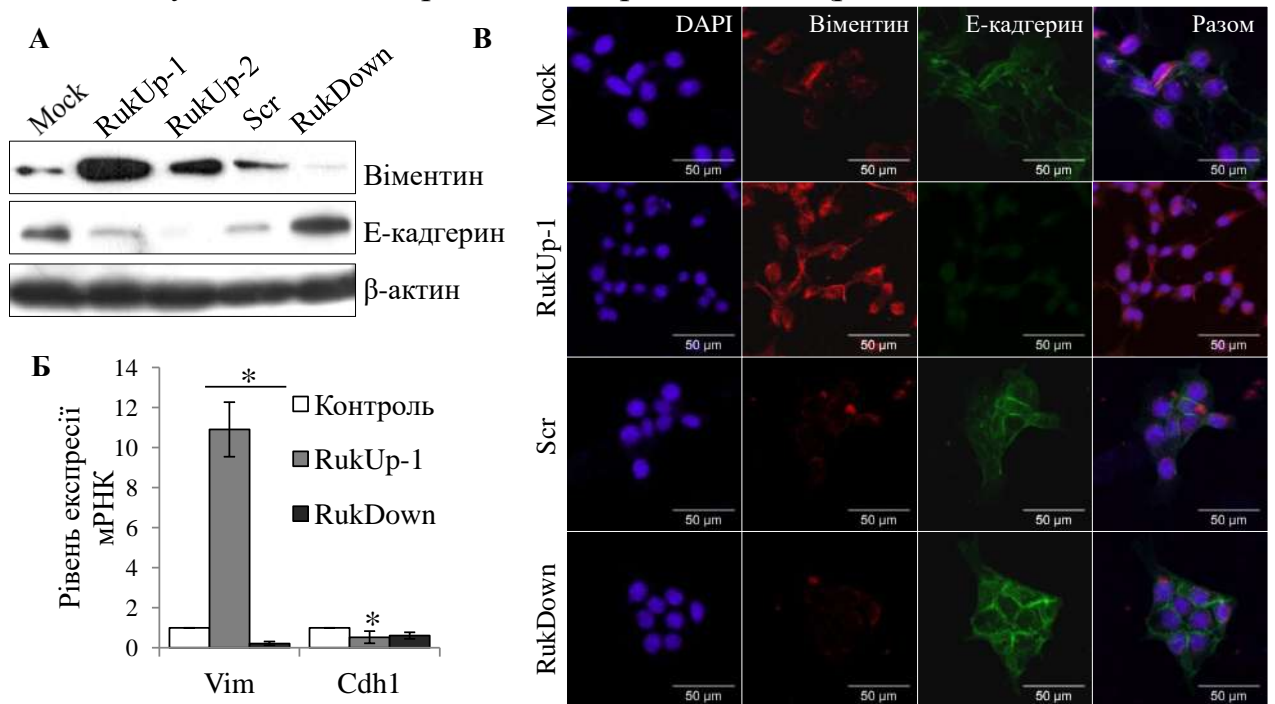


Рис. 3.9 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює вміст і експресію маркерів ЕМТ (Е-кадгерину та віментину) у клітинах 4Т1 залежно від рівня його експресії. А - вміст, Б - рівні експресії мРНК та В - імунофлуоресцентне барвлення віментину та Е-кадгерину. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

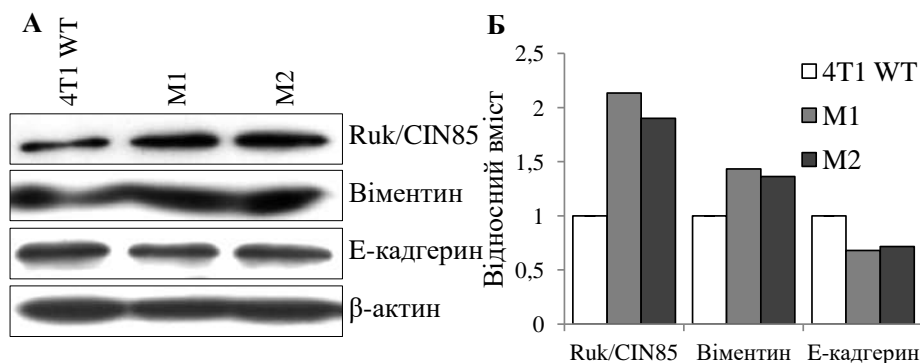


Рис. 3.10 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 необхідний для підтримання високоінвазивного ЕМТ-індукованого стану. А – Вестерн-блот аналіз вмісту Ruk/CIN85, віментину та Е-кадгерину у високоінвазивній субпопуляції клітин 4Т1, Б – Денситометричний аналіз результатів Вестерн-блот аналізу

Аналіз рівнів експресії генів, які контролюють адгезію клітини, показав, що експресія протеїну щільних контактів *Tjp1*, *Icam1*, фібронектину 1 *Fn1*, інтегрину $\beta 1$ *Itgb1*, кофіліну 1 *Cfl1* знижується у клітинах 4Т1 з надекспресією Ruk/CIN85, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 мало протилежні наслідки (рис. 3.12). Цікаво зазначити, що ці дані узгоджуються з одержаними результатами про негативну кореляцію між адгезивністю клітин лінії 4Т1 і рівнем експресії в них Ruk/CIN85 (див. рис. 3.3).

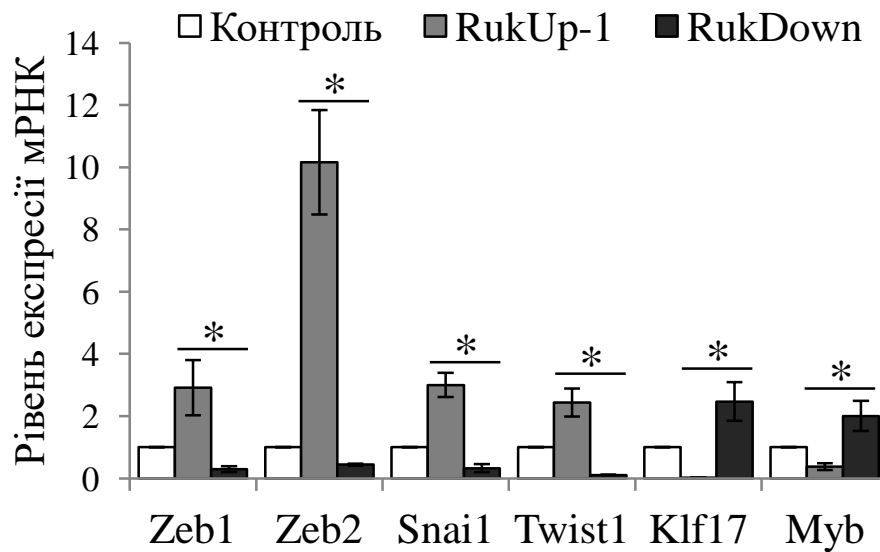


Рис. 3.11 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію транскрипційних факторів, залучених до контролю ЕМТ, у клітинах 4Т1. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

Пухлино-асоційоване запалення є необхідним чинником метастазування [238]. Тому на наступному етапі було здійснено оцінку рівнів експресії медіаторів запалення у клітинах 4Т1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, а саме інтерлейкінів *Il1a*, *Il6*, фактора некрозу пухлин (*Tnf*), цитокінів *Ccl2*, *Cxcl5*, секреторного протеїну ліпокаліну-2 (*Lcn2*). Було встановлено, що при надекспресії Ruk/CIN85 достовірно зростають рівні експресії прозапальних цитокінів *Il1a* та *Il6*, хемокіна *Cxcl5*, і *Lcn2*, та знижуються рівні експресії *Tnf* та *Ccl2*. Пригнічення експресії Ruk/CIN85 супроводжується протилежними ефектами (рис. 3.13).

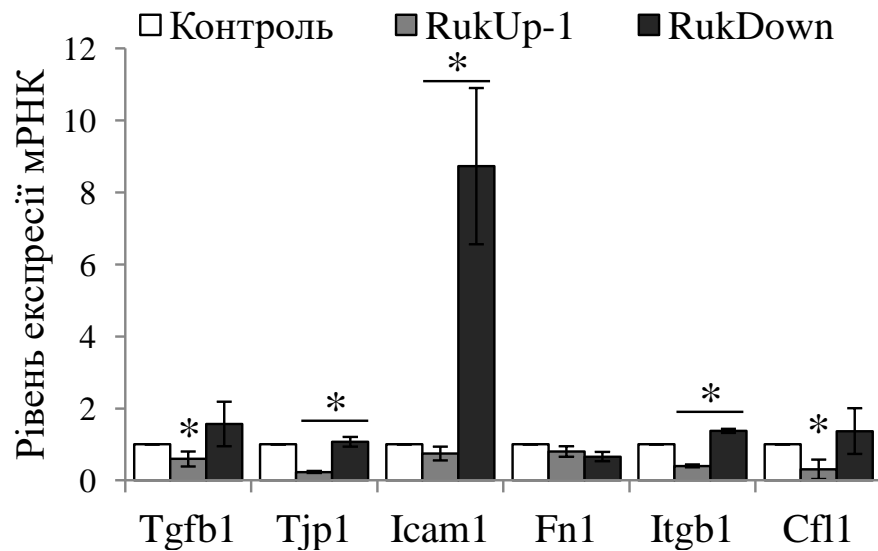


Рис. 3.12 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію молекул адгезії у клітинах 4T1. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

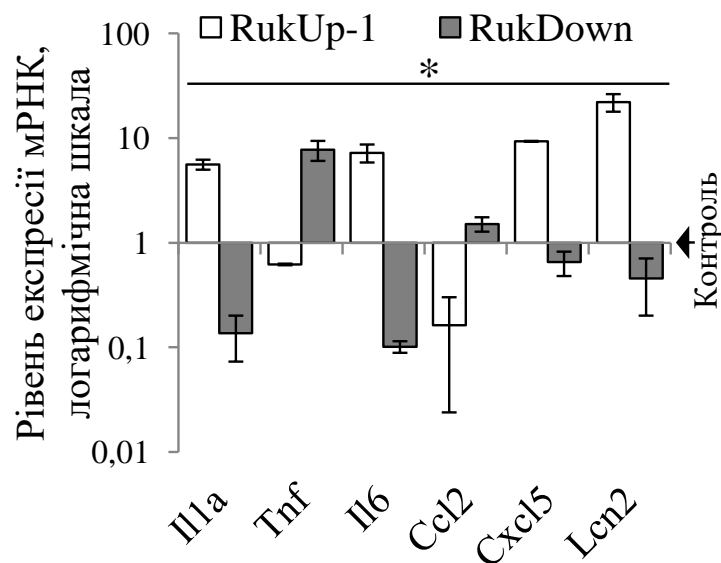


Рис. 3.13 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію генів, залучених до контролю запалення й імунної відповіді, у клітинах 4T1. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

EMT призводить до індукування в карциномних клітинах експресії протеїназ, скерованих на розщеплення компонентів позаклітинного матриксу, що полегшує інвазію пухлинних клітин. Методом ПЛР в реальному часі було проаналізовано рівні експресії мРНК ензимів, залучених до перичелюлярного

протеолізу, у клітинах 4Т1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (рис. 3.14). Було продемонстровано, що високоінвазивна сублінія 4Т1 RukUp-1 характеризується зниженням експресії низки ензимів, що беруть участь у деградації позаклітинного матриксу, а саме металопротеїназ *Mmp2*, *Mmp9* та мембрано-асоційованої *Mmp14*, а також катепсину D *Ctsd*, тоді як в клітинах з пригніченням Ruk/CIN85 спостерігається зростання рівня експресії генів зазначених протеїназ. Профілювання експресії низки протеїназ дозволяє зробити висновок, що надекспресія Ruk/CIN85 веде до пригнічення перичелюлярного протеолізу, що потенційно може свідчити про амебоїдний, а не мезенхімний тип міграції цих клітин. Аналіз рівня експресії компонентів системи активації плазміногену показав, що при надекспресії Ruk/CIN85 зростає рівень експресії урокінази *Plau* та її інгібітора PAI-1 *Serpine1* та знижується рівень експресії рецептора до урокінази *Plaur*, тоді як клітини 4Т1 зі зниженою експресією Ruk/CIN85 мають протилежні характеристики.

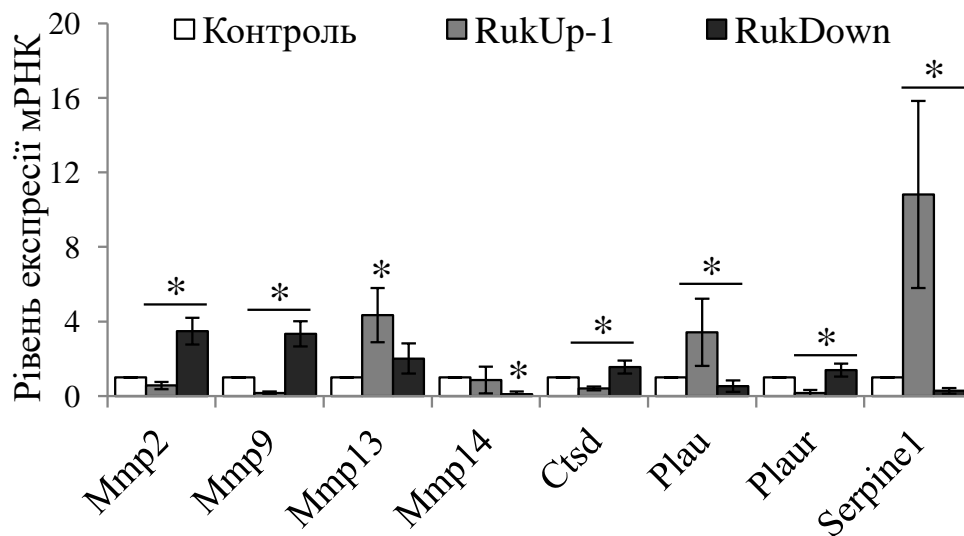


Рис. 3.14 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію генів, залучених до деградації ЕСМ. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

В даній дисертаційній роботі вперше було охарактеризовано зміни транскриптому, асоційовані з ЕМТ, залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Було виявлено, що за умов надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4Т1 достовірно зростають рівні експресії ключових

транскрипційних факторів, що контролюють EMT – Twist1, Snai1, Zeb1/2, а down-регулювання Ruk/CIN85, навпаки, веде до пригнічення експресії цих генів. З даних літератури відомо, що транскрипційний фактор Zeb1 є ключовим репресором E-кадгерину і забезпечує EMT [239]. Також, Zeb1 індукуює експресію та продукування VEGF у клітинах раку грудної залози за участі сигнальних шляхів, залежних від PI3K і p38/MAPK, а також посилює ангиогенез і туморогенез *in vivo* [240]. Twist належить до класу А базових helix-loop-helix-вмісних транскрипційних факторів. Експресія Twist в пухлинах грудної залози асоціюється з високою агресивністю, посиленням ангиогенезом, метастазуванням [241, 242] та формуванням гормоно-резистентного, негативного за естрогеновим рецептором, статусу [243]. Підвищена експресія Twist у первинних пухлинах грудної залози є маркером швидкого росту пухлини, наявності метастазів у лімфовузлах та високого ядерного показника (nuclear grade), що є ознакою дедиференціювання пухлинних клітин [244]. Аналіз експресії генів, які індукуються надекспресією Twist у низькоінвазивних клітинах грудної залози людини лінії MCF-7 та первинних пухлинах людини виявив, що переважна кількість Twist-залежних генів, які необхідні для метастазування *in vivo*, експресувались також і на моделі *in vitro*. Було встановлено, що Twist активує сигнальні шляхи GTP-ази Rho, IL-6 та JAK/STAT [245], які контролюють процеси міграції, інвазії, ангиогенезу та проліферації пухлинних клітин. ТФ з родини SNAIL контролюють адгезивність, форму клітини, а також її виживаність та проліферацію [246]. Показано, що експресія Snai1 та Slug посилює стійкість як пухлинних, так і нормальних клітин на етапі ембріогенезу до апоптозу [247, 248].

Цікавими виявились експериментальні дані про те, що рівень експресії Ruk/CIN85 негативно корелює із експресією ТФ Klf17 і Myb. Klf17 функціонує як негативний регулятор EMT та інвазивності пухлинних клітин. Він пригнічує експресію Id1, який, у свою чергу, підтримує недиференційований стан пухлинних клітин. На моделі клітин 4T1 було показано, що експресія Klf17 веде до зниження метастатичного потенціалу цих клітин, тоді як пригнічення

експресії Klf17, навпаки, супроводжується ЕМТ, посиленням інвазії та метастазування в легені [249]. Myb був виявлений як проонкоген. Проте, на сьогодні відомо, що його роль у функціонуванні пухлинних клітин неоднозначна. На ER⁺ клітинах раку грудної залози лінії MCF-7 показано, що у відповідь на стимуляцію TGF β , Myb стимулює ЕМТ у цих клітинах, а також інвазивність та здатність до росту в неприкріпленому стані, що свідчить про зростання агресивності клітин MCF-7 [250]. З іншого боку, надекспресія Myb у тричі негативних клітинах лінії 4T1 супроводжується пригніченням колонізації легені та метастазування [251].

З огляду на знижену адгезивність клітин 4T1 RukUp-1, очікуваним було встановлення негативного ефекту Ruk/CIN85 на експресію генів, які контролюють адгезивність клітин, що може свідчити про залученість цього адаптерного протеїну до мезенхімно-амебоїдного/амебоїдно-мезенхімного переходів. Ми не виявили достовірних змін в експресії TGF β в клітинах з різним вмістом Ruk/CIN85. Водночас, відомо, що Ruk/CIN85 збільшує тривалість експозиції рецептора до TGF β на мембрані клітини, і таким чином індукує більш пролонговане TGF β -залежне сигналювання, що супроводжується фосфорилуванням MAPK p38, зростанням експресії фібронектину і Snail, зниженням експресії E-кадгерину, що в комплексі веде до зростання рухливості пухлинних клітин [87]. TGF β – це ключовий індуктор ЕМТ в карциномних клітинах. Залежне від TGF β сигналювання веде до активації Snail, Twist, ZEB1/2 транскрипційних факторів, і як наслідок – індукції мезенхімних маркерів і репресії епітелійних [252].

Нами було виявлено потужне посилення експресії ліпокаліну-2 (Lcn-2) у клітинах сублінії RukUp-1 і значне пригнічення експресії цього гена в клітинах RukDown. Ліпокаліни – це невеликі позаклітинні протеїни, які зв'язують ліпофільні ліганди і транспортують їх до рецептора. Лігандами ліпокалінів можуть бути ретиноева кислота, прогестерон і простагландини [253]. Окрім того, є дані про залучення ліпокалінів до синтезу і дозрівання позаклітинних ензимів, ангіогенезу, імуномодулювання [254, 255]. Показано, що ліпокалін-2

(інша назва – NGAL, neutrophil gelatinase-associated lipocalin) взаємодіє з MMP-9 і захищає її від автодеградації [256]. Ліпокалін-2 залучений до прогресії раку грудної залози: його вміст у крові зростає у мишей з пухлиною і порівнянні зі здоровими тваринами [257], а в людини його вміст корелює з ER⁺ статусом, наявністю метастазів і поганою виживаністю [258]. Янг та співавтори показали, що ліпокалін-2 може індукувати EMT в низькоінвазивній лінії карциноми грудної залози людини MCF-7, що супроводжується посиленнями інвазією та метастазуванням в лімфовузлі [259, 260]. Ймовірно, така потужна стимуляція експресії Lcn-2 у клітинах 4T1 при надекспресії Ruk/CIN85 може бути одним із механізмів посилення агресивності цих клітин.

Окрім Lcn-2, ми виявили зростання експресії Il-1, Il-6, та Cxcl5 у клітинах 4T1 сублінії RukUp-1, що свідчить про прозапальний фенотип цих клітин, і пригнічення експресії вказаних генів в клітинах сублінії RukDown. Запалення, зокрема продукування Il-6, може бути індуктором EMT в карциномних клітинах [261], а хронічне запалення є фактором ризику для розвитку багатьох типів раку, в тому числі й раку грудної залози, легені, товстої кишки, меланоми [262]. Показано, що продукування Il-6 та Il-8 може стимулюватись у залежний від Zeb2 спосіб, що супроводжується прогресією раку грудної залози [263].

Аналіз експресії генів, що кодують ензими деградації ЕСМ, показав, що клітини 4T1 сублінії RukUp-1 характеризуються пригніченням експресії MMP-2, MMP-9 і катепсину D, і, ймовірно, пригніченим перицелюлярним протеолізом. Хоча ці ензими відіграють важливу роль для інвазії багатьох типів пухлин [264, 265], проте внаслідок активації програми мезенхімно-амебоїдного переходу пухлинна клітина може залучати альтернативний спосіб міграції, амебоїдний, який не потребує розщеплення компонентів ЕСМ і при цьому є на порядок ефективнішим за мезенхімну міграцію [166, 167]. З даних літератури відомо, що застосування інгібіторів металопротеїназ, наприклад, Іломастату, з метою пригнічення метастазування пухлини, може індукувати Rho-залежне сигналювання і амебоїдний тип міграції [266]. Ймовірно, клітини сублінії RukUp-1 мають ознаки як мезенхімного, так і амебоїдного типу міграції, про що

свідчать пригнічення адгезивності, округла форма клітини, пригнічення експресії протеолітичних ензимів разом з посиленою експресією віментину та індукцією ЕМТ. Цікаво, що клітини сублінії RukDown мають пригнічену інвазивність, хоча експресія MMP-2, MMP-9 і катепсину D в цих клітинах зростає. З даних літератури відомо, що як наслідок активації металопротеїназ можуть утворюватись ангіостатини, які пригнічують інвазивність і ангіогенез пухлинних клітин [267]. Матриксні металопротеїнази можуть пригнічувати метастазування і за іншими механізмами: MMP-2, наприклад, залучена до репарації судин і пригнічення екстравазування [268].

Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію ключових транскрипційних факторів, що регулюють диференціювання, рухливість та інвазивність пухлинної клітини, молекул адгезії, запалення, ремоделювання і деградації позаклітинного матриксу, і, як наслідок, функціонує як регулятор процесів ЕМТ/МЕТ, які лежать в основі контролю інвазивності та метастазування пухлинних клітин.

3.4 Дослідження біохімічних та молекулярних маркерів МЕТ/МЕТ (активностей металопротеїназ і лізилоксидази, продукування ангіостатинів та особливостей організації актинового цитоскелету) в клітинах 4T1 з різним рівнем експресії Ruk/CIN85

Епітелійно-мезенхімний перехід веде до набуття пухлинними клітинами рухливого фенотипу, характерними рисами якого є втрата міжклітинних контактів та апікально-базальної полярності, зростання адгезивності до молекул позаклітинного матриксу та посилення позаклітинного протеолізу. Однак, пухлинна клітина, завдяки властивій їй пластичності, може здійснювати перехід до амебоїдного типу, який характеризується більшою ефективністю, втратою контактів з елементами позаклітинного матриксу, пригніченням позаклітинного протеолізу, перебудовами актинового цитоскелету (появи т.зв. кортикального актинового кільця, англ. – cortical actin ring та специфічних вип'ячувань, англ. –

blebs) та підвищеною активністю малих GTP-аз родини Rho [167]. Одержані нами попередні результати стосовно округлої форми клітин сублінії RukUp-1, їх зниженої адгезивності та інгібування перицелюлярного протеолізу, наштовхнуло на гіпотезу про те, що ці клітини можуть мігрувати за амебоїдним типом [166, 174].

Для того, щоб перевірити, чи відповідають зміни в експресії металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 рівню їх активності, ми оцінювали желатинолітичну активність у кондиційованому середовищі клітин 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85. Було встановлено, що активності MMP-2 та MMP-9, як і їх експресія, достовірно знижуються у клітинах сублінії RukUp-1, та зростає у клітинах сублінії RukDown (рис. 3.15, А), що корелює з результатами ПЛР в реальному часі. Ці дані засвідчують, що клітини RukUp-1 переважно не залучають активності MMP-2 і MMP-9 для деградації позаклітинного матриксу.

Щоб підтвердити припущення про амебоїдну морфологію клітин RukUp-1, ми забарвили ці клітини TRITC-фалоїдином для візуалізації актинового цитоскелету. За результатами конфокальної мікроскопії, клітини RukUp-1, які зазнали округлення, одночасно набули ознак, необхідних для підтримання амебоїдної рухливості, включаючи формування кортикального F-актинового кільця та мембранних вип'ячувань - блебів (рис. 3.15, Б).

Для амебоїдного типу інвазії характерне також зростання активності лізилоксидази – ензиму, який каталізує утворення зшивок між залишками лізину у молекулах колагену та еластину, що полегшує рух пухлинних клітин між волокнами позаклітинного матриксу [269]. Аналіз рівнів експресії *Lox* та ще одного представника родини лізилоксидаз, *Loxl2* (Lox-like 2), яка асоційована з посиленням метастазуванням клітин раку грудної залози [270], показав, що рівень експресії *Lox* позитивно корелює із рівнем експресії Ruk/CIN85 у клітинах RukUp-1, тоді як рівень експресії *Loxl2* достовірно знижується за умов пригнічення експресії Ruk/CIN85 в клітинах RukDown (рис. 3.15, В). Зміни у рівні експресії LOX в клітинах з надекспресією Ruk/CIN85 узгоджуються з підвищенням активності ензиму у кондиційованому середовищі порівняно з контрольними значеннями (рис. 3.15, Г).

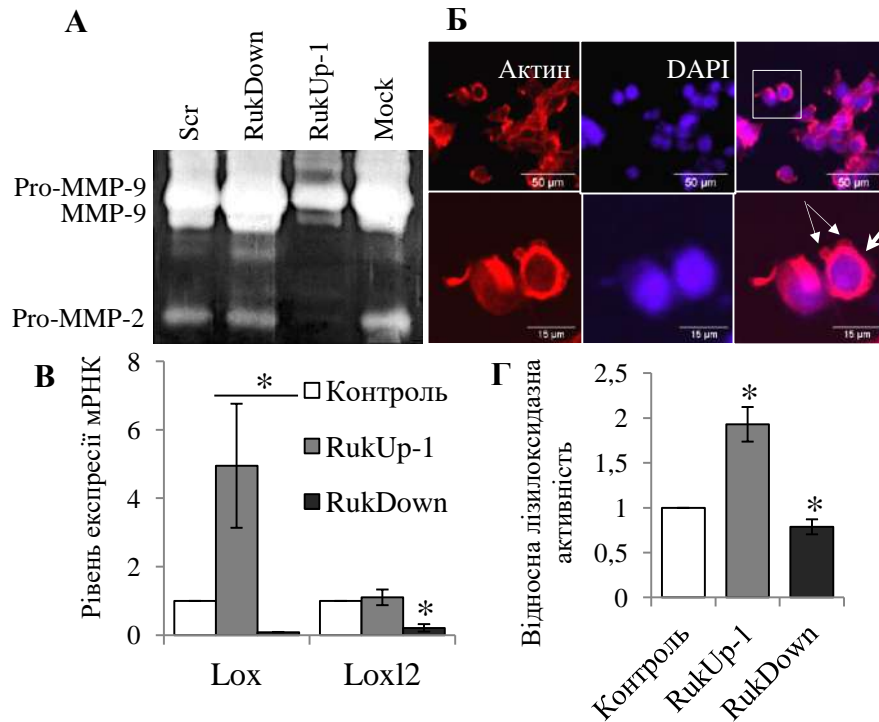


Рис.3.15 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює прояв ознак, асоційованих з амебоїдним типом міграції й інвазії. А – желатинова зимографія матриксних металопротеїназ MMP-2 та MMP-9 у кондиційованому середовищі клітин 4Т1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Б - Флуоресцентне барвлення актинового цитоскелету клітин сублінії RukUp-1 TRITC-фалоїдином. Ядра забарвлювали DAPI. Білими стрілками вказано актинове кільце та вип'ячування мембрани. В – рівні експресії мРНК лізилоксидаз *Lox* і *Lox12*. Г – лізилоксидазна активність в кондиційованому середовищі клітин субліній 4Т1. * - $p < 0,05$ відносно відповідного контролю, $n=4$

Таким чином, нами продемонстровано, що поряд з пригніченням експресії, у клітинах 4Т1 з надекспресією Ruk/CIN5 пригнічується і активність матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9. В сучасній літературі нагромаджуються дані, що свідчать про роль MMP-2/MMP-9 у процесі протеолізу плазміногену з утворенням ангіостатинів (крингл-вмісних фрагментів плазміногену), які можуть функціонувати як інгібітори ангіогенезу та росту пухлин *in vitro* та *in vivo* [271, 272]. Щоб перевірити існування таких складних регуляторних взаємовідносин між зазначеними

компонентами в клітинах 4T1 з підвищеною або пригніченою експресією Ruk/CIN85, ми проаналізували кондиційоване середовище та клітинні лізати Вестерн-блот-аналізом з використанням кролячих поліклональних антитіл до плазміногену, які розпізнають плазміноген, а також його вкорочені фрагменти, ангіостатини [210] (рис. 3.16, А). Виявлено, що смуга з молекулярною масою 50 кДа, що відповідає ангіостатину K1-4.5, виявляється тільки в клітинних лізатах, але не в кондиційованому середовищі, що свідчить про фізичну взаємодію протеїну з поверхнею клітини. Вміст ангіостатину був більш ніж у два рази вищим у клітинах RukDown і значно нижчим в клітинах RukUp-1 у порівнянні з відповідними контролями. Плазміноген виявляли переважно у кондиційованому середовищі, а в клітинних лізатах його вміст був значно нижчим. Найменший вміст плазміногену, попередника ангіостатину, було виявлено в кондиційованому середовищі клітин RukDown, тоді як в кондиційованому середовищі клітин RukUp-1 його вміст був у два рази вищим порівняно з контрольними значеннями. Таким чином, підвищене продукування ангіостатину(ів) у клітинах RukDown позитивно корелювало з вищою активністю як MMP-9, так і MMP-2, порівняно з клітинами RukUp-1.

Для оцінки впливу фрагментів плазмін(оген)у K1-3 (що містить крингл-вмісні фрагменти 1-3) та K5 (що містить крингл-вмісний фрагмент 5) на інвазивність вищоінвазивної сублінії 4T1 RukUp-1 використовували тест на інвазію через Матригель у модифікованій камері Бойдена. Продемонстровано, що як K1-3, так і K5 достовірно знижують приблизно удвічі ефективність інвазії через Матригель у порівнянні з контрольними клітинами RukUp-1 (рис. 3.16, Б, В).

Для того, щоб виявити, яка саме ланка позаклітинного протеолізу залучена до утворення ангіостатинів, було використано інгібітор металопротеїназ GM6001, інгібітор серинових протеїназ паранітрофенілгуанідинбензоат (pNFGB), та їх комбінацію (рис. 3.16, Г, Д). Встановлено, що при додаванні GM6001 до клітин низькоінвазивної сублінії

4T1 RukDown їх інвазивність зростала у 1,5 рази у порівнянні з контролем, що свідчить про поненційну роль металопротеїназ у контролі інвазивності через продукування ангіостатинів. При дії інгібітора серинових протеїназ спостерігали достовірне зниження інвазивності майже вдвічі. При сумісній дії обох інгібіторів інвазивність клітин сублінії 4T1 RukDown знижувалась незначно, проте достовірно.

Таким чином, серинові протеїнази, як важливі компоненти ремоделювання ЕСМ і регулятори динамічних змін в адгезивності, можуть відігравати взаємодоповнюючу роль(і), разом з матриксними металопротеїназами, у забезпеченні функціонального стану регуляторної мережі, необхідної для пригнічення міграційного та інвазивного потенціалу клітин 4T1.

Разом із пригніченням експресії та активності ензимів ремоделювання і деградації ЕСМ у клітинах сублінії RukUp-1, ми виявили зростання рівня експресії Lox і Lox12 та активності лізілоксидази в цих клітинах. LOX – це позаклітинна мідь-вмісна амінооксидаза, що каталізує процес окисного дезамінування залишків лізину і формування ковалентних зшивок у протеїнах сполучної тканини – колагені та еластині [273]. Експериментальні і клінічні дослідження демонструють незаперечну роль LOX у канцерогенезі. Показано, що високий рівень активності та експресії цього ензиму асоціюється з поганим прогнозом у пацієнтів з раком грудної залози [274], яєчників [275], простати [276], підшлункової залози [277], прямої кишки [278], шлунка [279] та легені [280], а її інгібітори, зокрема бета-амінопропіонітрил, розглядаються як перспективні протипухлинні агенти [281, 282]. Відомо, що за умов гіпоксії, у відповідь на стабілізацію транскрипційного фактора HIF1 α , індукується експресія LOX, що є ключовим ензимом, залученим до метастазування [274, 283]. Окрім того, в літературі є дані про залучення LOX до контролю ЕМТ, міграції, інвазивності, адгезивності пухлинних клітин шляхом активації сигнальних шляхів, залежних від кінази фокальної адгезії ФАК та нерцепторної

тирозинкінази Src [279, 284, 284]. LOX здатна стимулювати проліферацію пухлинних клітин шляхом утримання EGFR на мембрані клітини [285], активувати Akt-залежну експресію VEGF і таким чином посилювати ангиогенез [287, 288]. Показано, що пригнічення експресії *Loxl2* у клітинах карциноми нирки супроводжується зниженням інвазивності та пригніченням ЕМТ за участі Src/FAK-залежного сигнального шляху [289]. З іншого боку, більш пізні роботи демонструють, що пропептид LOX-PP, який утворюється шляхом позаклітинного протеолізу проензиму, навпаки, пригнічує ріст пухлин печінки [290], простати [291], молочної залози [292] та шлунка [293], що свідчить про різноспрямований вплив зрілої LOX і LOX-PP [294]. Сато та співавтори показали, що SH3 домен LOX-PP може взаємодіяти з Ruk/CIN85 і пригнічувати Ruk/CIN85-індуковану інвазивність [295].

Таким чином, одержані нами результати свідчать про те, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 мають ознаки амебоїдного типу міграції: зниження адгезивності, пригнічення перицелюлярного протеолізу, наявність кортикального актинового кільця, та активація лізілоксидази. Ймовірно, надекспресія Ruk/CIN85 індукує в клітинах лінії 4T1 мезенхімно-амебоїдний перехід, внаслідок чого ці клітини набувають змішаного мезенхімно-амебоїдного фенотипу (рис. 3.1, 3.16) та характеризуються посиленням міграційної активності [166].

3.5 Дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі розвитку ознак, властивих раковим стовбуровим клітинам (експресії маркерів CSCs, формування мамосфер, росту в напіврідкому агарі, хіміорезистентності)

Ракові стовбурові клітини (Cancer stem cells, CSCs) – це невелика субпопуляція клітин пухлини, здатних до самовідтворення та ініціювання розвитку пухлини, в тому числі й метастазів. CSCs характеризуються експресією маркерів дедиференціювання, специфічних поверхневих маркерів, активацією «ембріональних» сигнальних шляхів, підвищеною хіміо- та радіорезистентністю, стійкістю до апоптозу [296]. Також продемонстровано, що

прояв ознак ракових стовбурових клітин корелює із наявністю маркерів ЕМП, підвищеною інвазивністю, здатністю до метастазування та радіорезистентністю пухлин різного походження [297, 298].

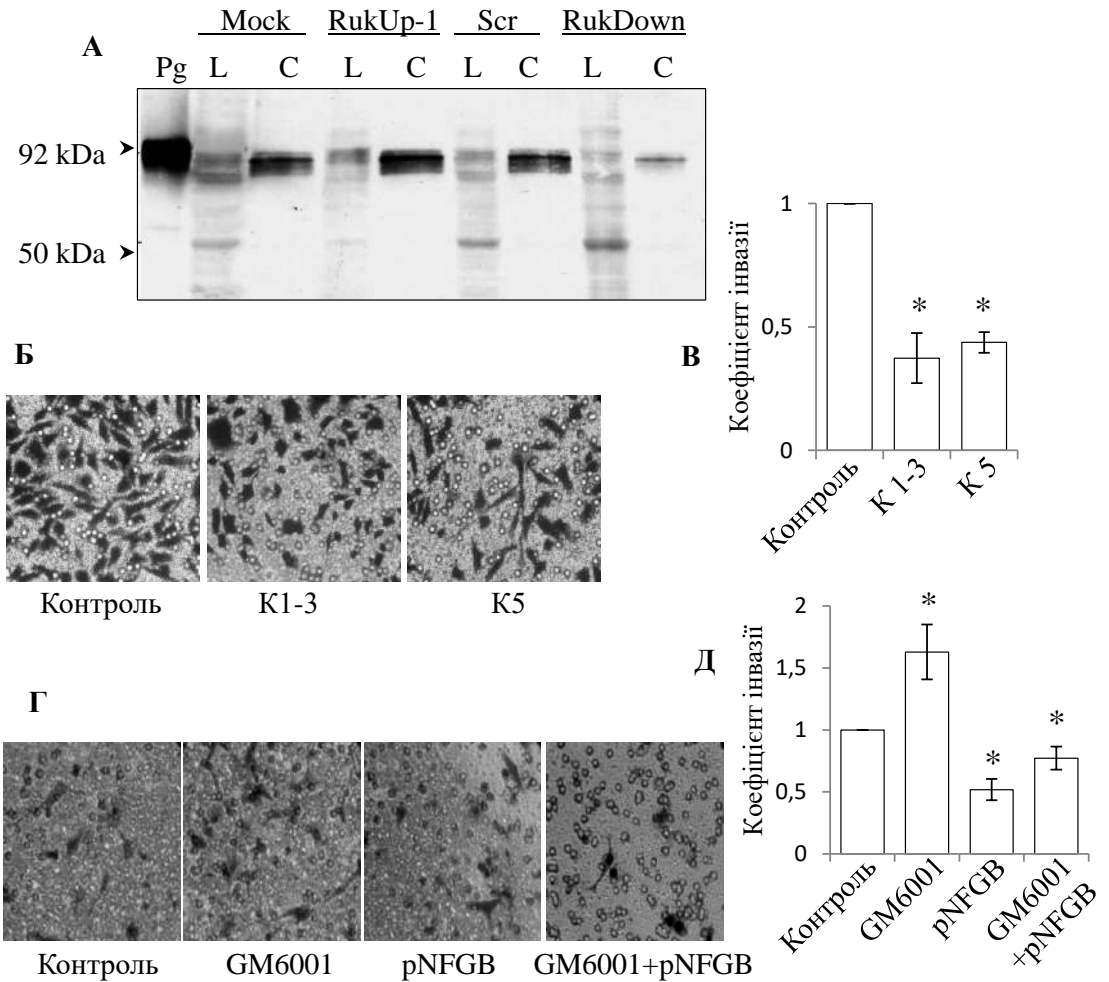


Рис. 3.16 Матриксні металопротеїнази пригнічують інвазивність клітин 4Т1 шляхом продукції ангіостатинів. А - вміст ангіостатинів у лізатах (L) та кондиційованому середовищі (C) клітин субліній 4Т1. Як позитивний контроль використовували препарат плазміногену (Pg). Б, В – вплив ангіостатинів K1-3 і K5 на інвазивність клітин високоінвазивної сублінії RukUp-1 (Б – репрезентативні зображення клітин, що проінвазували через шар Матригелю, В – значення коефіцієнта інвазивності). Г, Д – вплив інгібітора ММРаз GM6001 і інгібітора серинових протеїназ pNFGB - на низькоінвазивні клітини RukDown (Г – репрезентативні зображення клітин, що проінвазували через шар Матригелю, Д – значення коефіцієнта інвазивності). * - $p < 0,05$ відносно нестимульованого контролю, $n=3$

Одним із ймовірних шляхів походження ракових стовбурових шляхів є дедиференціювання та репрограмування клітин-попередників [299]. З метою дослідження впливу адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на рівні експресії генів, пов'язаних із репрограмуванням, було оцінено за допомогою кількісної ПЛР рівні експресії транскрипційних факторів *Klf4*, *Pou5f1*, *Sox2* і *Myc* («факторів Яманаки»), а також *Nanog* та *Id1*. Було показано, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 достовірно зростає рівень експресії ТФ *Klf4*, а при пригніченні експресії Ruk/CIN85 достовірно знижується рівень експресії ТФ *Pou5f1*. Також, продемонстровано пряму залежність між рівнем експресії Ruk/CIN85 і фактора репрограмування *Nanog*, та зростання рівня експресії інгібітора диференціювання *Id1* як при зростанні, так і при зниженні експресії Ruk/CIN85 (рис. 3.17, А) [300].

Показано, що KLF4 необхідний для підтримання популяції CSCs, міграції та інвазії клітин раку молочної залози людини ліній MCF-7 та MDA-MB231 [301]. Також, на моделі клітин раку молочної залози миші лінії 4T1 продемонстровано, що клітини 4T1 з високим рівнем експресії Oct4 характеризуються експресією специфічних маркерів CSCs, здатністю до формування мамосфер та значним туморогенним потенціалом *in vivo*, і навпаки [302]. ТФ Nanog контролює підтримання плюрипотентного стану клітин та їх здатність до самовідтворення, а високий рівень експресії цього ТФ стимулює ріст пухлин та метастазування клітин раку грудної залози [303].

Для ідентифікації CSCs використовують специфічні маркери, зокрема для CSCs грудної залози властивий фенотип $CD44^+CD24^{-low}$ [304]. Було проаналізовано рівні експресії поверхневих маркерів *Cd44* та *Cd24* у клітинах 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 і встановлено, що у клітинах сублінії RukUp-1 достовірно зростає рівень експресії *Cd44* і знижується - *Cd24* у порівнянні з відповідним контролем, тоді як для сублінії RukDown виявлено протилежну закономірність (рис. 3.17, Б). Ці дані дозволяють зробити висновок, що при надекспресії адаптерного протеїну

Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зростає розмір субпопуляції $CD44^+CD24^{low}$ клітин, які проявляють ознаки CSCs [300].

CD44 - це поверхневий глікопротеїн, рецептор гіалуронової кислоти, залучений до диференціювання, міграції, ангиогенезу, регулювання проліферації та виживаності. Сигналювання, що залежить від поверхневого глікопротеїну CD24, контролює процеси проліферації, диференціювання та апоптозу. Високий коефіцієнт відношення CD44/CD24 вважається надійною характеристикою CSCs раку молочної залози і є індикатором їх високого туморогенного потенціалу [305].

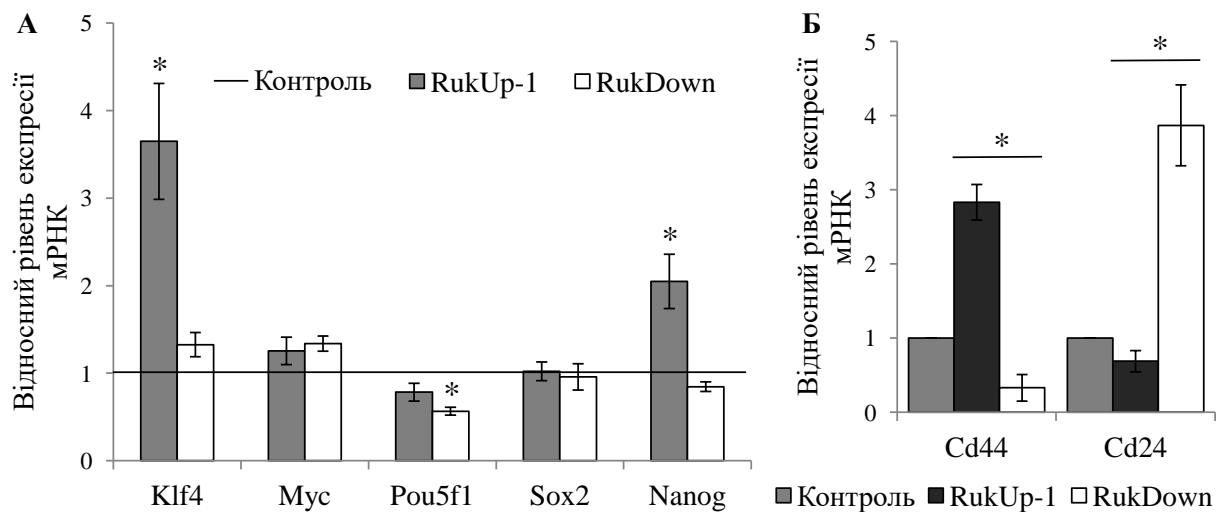


Рис. 3.17 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію генів, залучених до репрограмування (А), та поверхневих маркерів ракових стовбурових клітин грудної залози (Б). * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=4$

Поряд із співвідношенням експресії CD44/CD24, для характеристики CSCs раку молочної залози використовують такий показник, як рівень активності ензиму детоксикації альдегіддегідрогенази (АЛДГ), яку пов'язують із міграцією та метастазуванням пухлинних клітин [305]. Альдегіддегідрогеназа належить до родини НАД(Ф)⁺-залежних ензимів, залучених до детоксикації широкого спектру альдегідів шляхом їх перетворення на слабкі карбонові кислоти. Активація АЛДГ може бути

одним із механізмів хіміорезистентності пухлинних клітин і розглядається як ознака CSCs. Активність АЛДГ оцінювали хемілюмінісцентним методом за продукуванням H_2O_2 [214]. Як видно з рис. 3.18, існує пряма залежність між активністю досліджуваного ензиму та рівнем експресії Ruk/CIN85. Так, активність АЛДГ виявилась приблизно в 1.5 рази вищою для клітин RukUp-1 і в 1.5 рази нижчою – для клітин RukDown порівняно з відповідними контрольними клітинами. У попередніх дослідженнях на моделі аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 нами було виявлено, що активність АЛДГ зростає у разі надекспресії Ruk/CIN85 [306], що свідчить про залучення цього адаптерного протеїну до регулювання експресії й активності основних маркерів ракових стовбурових клітин.

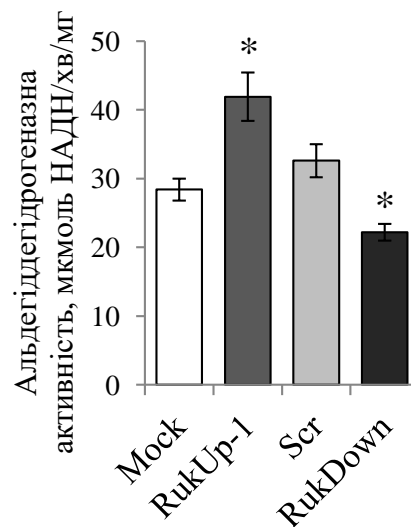


Рис. 3.18 Активність альдегіддегідрогенази у клітинах 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=4$

Одними з ключових властивостей CSCs є їх здатність до самовідтворення та стійкість до апоптозу (запрограмованої клітинної загибелі, що індукується відсутністю прикріплення клітин до субстрату), що є передумовою підвищеної туморогенності. Тому, на наступному етапі було досліджено здатність субліній клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 до формування сфероїдів (мамосфер) при культивуванні на низькоадгезивному пластику за

детермінованих умов. Виявлено, що клітини усіх досліджуваних субліній мають здатність утворювати сфероїди на низькоадгезивному пластику за детермінованих умов. Контрольні клітини Mock та Scr формують компактні, з щільними міжклітинними контактами сфероїди. Водночас, клітини з надекспресією Ruk/CIN85 формують достовірно більшу кількість сфероїдів, які характеризуються неправильною формою у порівнянні з кулеподібною формою сфероїдів контрольних клітин. При серійному пасажуванні протягом ще трьох пасажів виявлено, що на кожному з наступних пасажів клітини з надекспресією Ruk/CIN85 формують більшу кількість сфероїдів, аніж відповідні контрольні клітини (рис. 3.19), причому особливості морфології сфероїдів зберігаються. Клітини сублінії RukDown утворюють сфероїди правильної округлої форми, кількість яких була достовірно нижчою у порівнянні з контролем [300].

Зростання частки CSCs у пухлинах призводить до посилення резистентності онкологічних хворих до хіміо- та рідотерапії і, як наслідок, до поганого прогнозу [307]. Для дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у набутті ознак CSCs було досліджено виживаність субліній клітин 4T1 за присутності доксорубіцину. Встановлено, що виживаність клітин сублінії RukUp-1 достовірно зростає при дії 0.1 та 1.0 μM доксорубіцину, тоді як виживаність клітин сублінії RukDown знижувалась достовірно при 0.1, 1.0 та 10 μM протипухлинного агенту (рис. 3.20, А). Окрім того, надекспресія Ruk/CIN85 супроводжувалась достовірним зростанням IC_{50} доксорубіцину, а при пригніченні експресії Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 IC_{50} доксорубіцину достовірно знижувалась (рис. 3.20, Б).

Додатково було проаналізовано здатність клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 до формування колоній в напіврідкому агарі за присутності доксорубіцину. Було встановлено, що за контрольних умов (у відсутності доксорубіцину) усі досліджувані сублінії мали здатність до формування колоній в напіврідкому агарі, але контрольні сублінії Mock та Scr утворювали колонії правильної форми, з гладкою поверхнею; колонії, утворені клітинами сублінії RukDown, також мали правильну форму і загалом

нагадували контрольні, але характеризувались більшими розмірами; клітини RukUp-1 формували достовірно більшу кількість колоній неправильної форми, з нерівними краями (рис. 3.21, А), що свідчить про зростання їхнього трансформувального потенціалу, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 супроводжувалось достовірним зниженням здатності до утворення колоній в напіврідкому агарі. За присутності доксорубіцину у концентраціях 0.01, 0.05 та 0.1 μM спостерігали достовірно більшу кількість колоній, утворених клітинами RukUp-1 у порівнянні з відповідним контролем, тоді як кількість колоній, утворених клітинами сублінії RukDown, була достовірно нижчою (рис. 3.21, Б) [308].

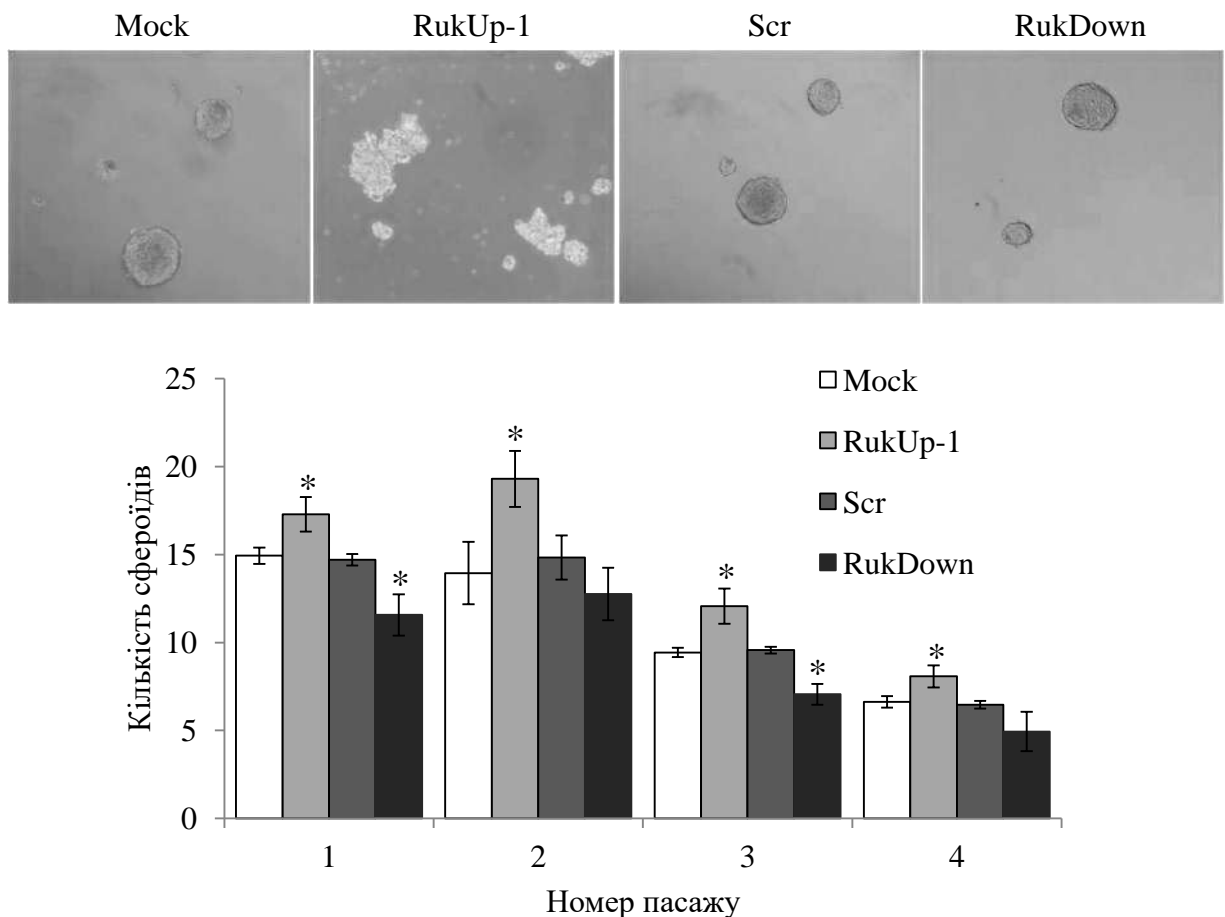


Рис. 3.19 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює здатність клітин 4Т1 формувати сфероїди. А – Репрезентативні фотографії сфероїдів при культивуванні на низькоадгезивному пластику. Б – кількість сфероїдів на 1-4 пасажах при серійному пасажуванні. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем на тому ж пасажі, $n=3$

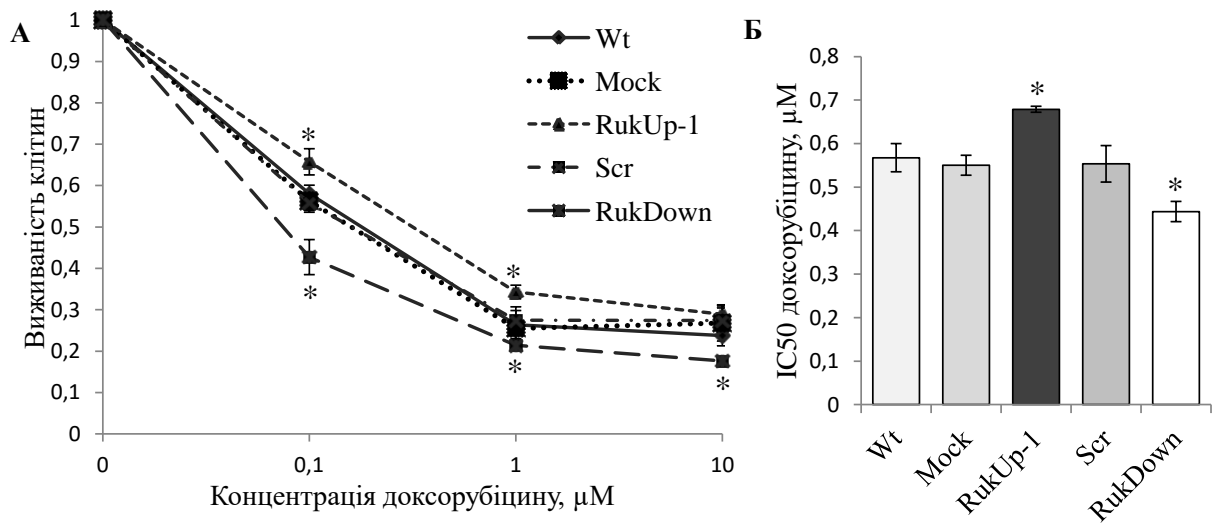


Рис. 3.20 Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює хіміорезистентність клітин субліній 4Т1 залежно від рівня його експресії. А – виживаність клітин 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85 у присутності доксорубіцину у концентраціях 0,1 – 10 μM . Б - значення IC_{50} доксорубіцину для клітин 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=4$

На сьогодні відомо, що резистентність пухлинних клітин до хіміотерапії може реалізуватись за рахунок різноманітних механізмів. Серед них: контроль прогресії клітинного циклу, посилена репарація пошкодженої ДНК, активація виведення препарату з клітини за участі ABC мембранних транспортерів чи знешкодження за участі альдегіддегідрогенази [197]. Окрім цього, до розвитку хіміорезистентності залучені сигнальні шляхи PI3K/Akt/mTOR, NF- κ B, p53 [306, 309, 310]. Попередні дослідження показали, що надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми грудної залози людини лінії MCF-7 супроводжується підвищенням резистентності до цисплатину і етопозиду, а також посиленим виключенням родаміну 123 [306], що узгоджується з результатами, одержаними в даній роботі. Відомо, що резистентні до доксорубіцину клітини лінії MCF-7 характеризуються пригніченням експресії гена TOP2A, продукт якого є основною мішенню доксорубіцину, а також підвищенням експресії мембранних ABC транспортерів, регуляторів клітинного циклу і проліферації [311]. З даних

літератури відомо, що Ruk/CIN85 може бути залучений до контролю апоптозу та виживаності пухлинної клітини. Ruk/CIN85 взаємодіє з MAPKKK MEKK4, що веде до активації MAPK p38, залученої до відповіді клітини на стрес [312]. У комплексі з Src, Ruk/CIN85 активує антиапоптичний сигнальний шлях TRAIL/MEKK4/p38/HSP27/Akt, який захищає клітини від загибелі при дії проапоптичного цитокіна TRAIL [98].

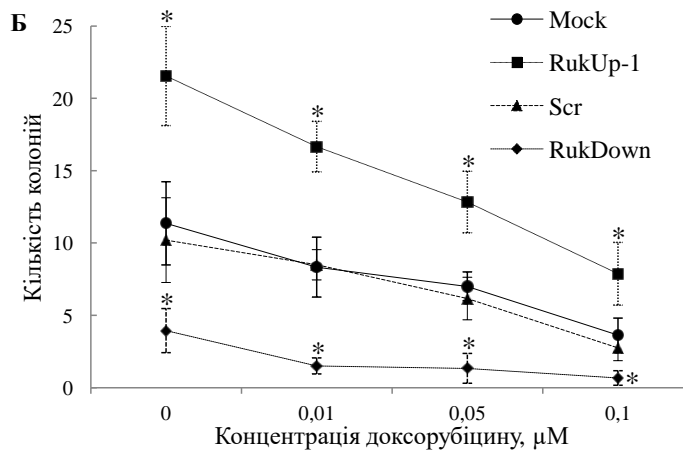
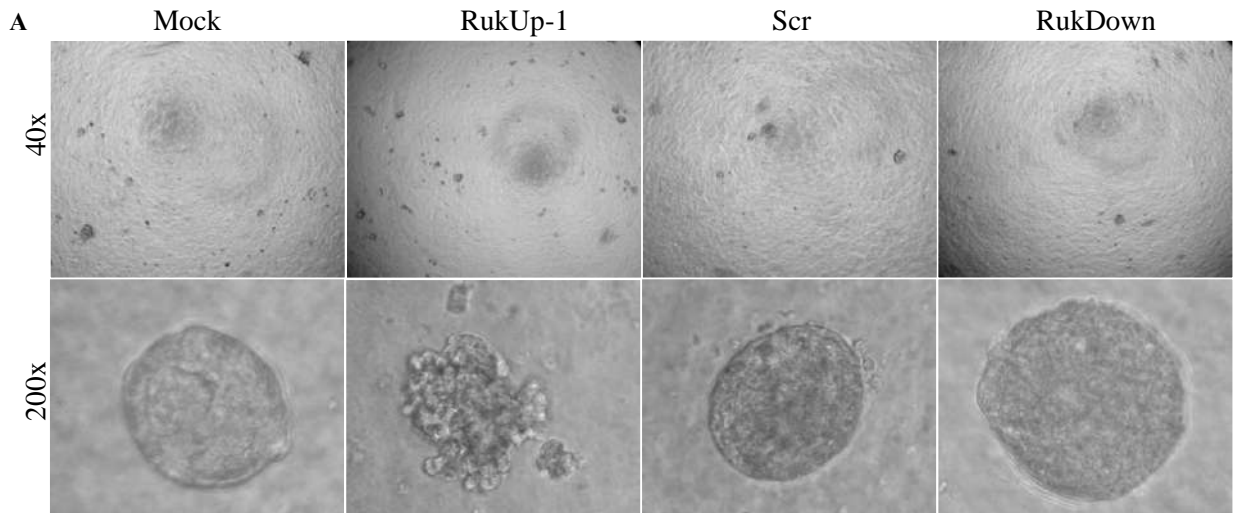


Рис. 3.21 Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується посиленням здатності формувати колонії в напіврідкому агарі. А – репрезентативні зображення колоній, отримані за допомогою інвертованого мікроскопа при збільшенні 40x і 200x. Б - кількість колоній в напіврідкому агарі, сформованих клітинами 4Т1 з різним вмістом Ruk/CIN85 за присутності доксорубіцину у концентраціях 0,01 – 0,1 μM . * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=3$

Таким чином, одержані в даній дисертаційній роботі результати свідчать про те, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується посиленням прояву ознак ракових стовбурових клітин, в тому числі хіміорезистентності [313], тоді як клітини з пригніченою експресією Ruk/CIN85 втрачають таку властивість.

3.6 З'ясування ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у метастазуванні *in vivo* (трансендотеліальна міграція, проникність капілярів легенів до барвника Evans Blue, ефективність колонізації легенів, метастазування в легені на моделі експериментального метастазування)

Одержані результати стосовно ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі адгезивності, рухливості, інвазивності свідчать про можливий ефект Ruk/CIN85 на пухлинний ріст та метастазування *in vivo*. Процес екстравазування (виходу пухлинних клітин з кровотоку в тканину органа-мішені) є ключовим у метастазуванні, алже саме на цьому етапі відбувається «хоумінг» і колонізація органа-мішені [111]. Для первинної оцінки ефективності екстравазування клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 було використано тест на міграцію пухлинних клітин через шар первинних ендотеліоцитів легені у модифікованій камері Бойдена (трансендотеліальна міграція, TEM), найбільш найближений до стану *in vivo*. Було встановлено, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються зростанням коефіцієнта TEM більш ніж у 10 разів, у порівнянні з контролем, тоді як клітини 4T1 з пригніченням експресії Ruk/CIN85 практично втрачають цю здатність (рис. 3.22, А). На моделі *in vivo* оцінювали проникність капілярів легені мишей лінії Balb/c (за проникністю для барвника Evans Blue), яким вводили внутрішньовенно клітини лінії 4T1 з різними рівнями експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85, та ефективність колонізації легені (за кількістю резистентних до 6-тіогуаніну колоній, що утворюються пухлинними клітинами, ізольованими з легені). Було продемонстровано, що через 24 год після введення пухлинних клітин досліджуваних субліній у

кровотік, у групі RukUp-1 достовірно зростала як проникність судин легені, так і кількість резистентних до 6-тіогуаніну колоній у порівнянні з контрольною групою Mock (рис. 3.22, Б-Г). Ці дані свідчать про те, що надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 веде до посиленого екстравазування *in vivo*, що може вказувати на зростання метастатичного потенціалу.

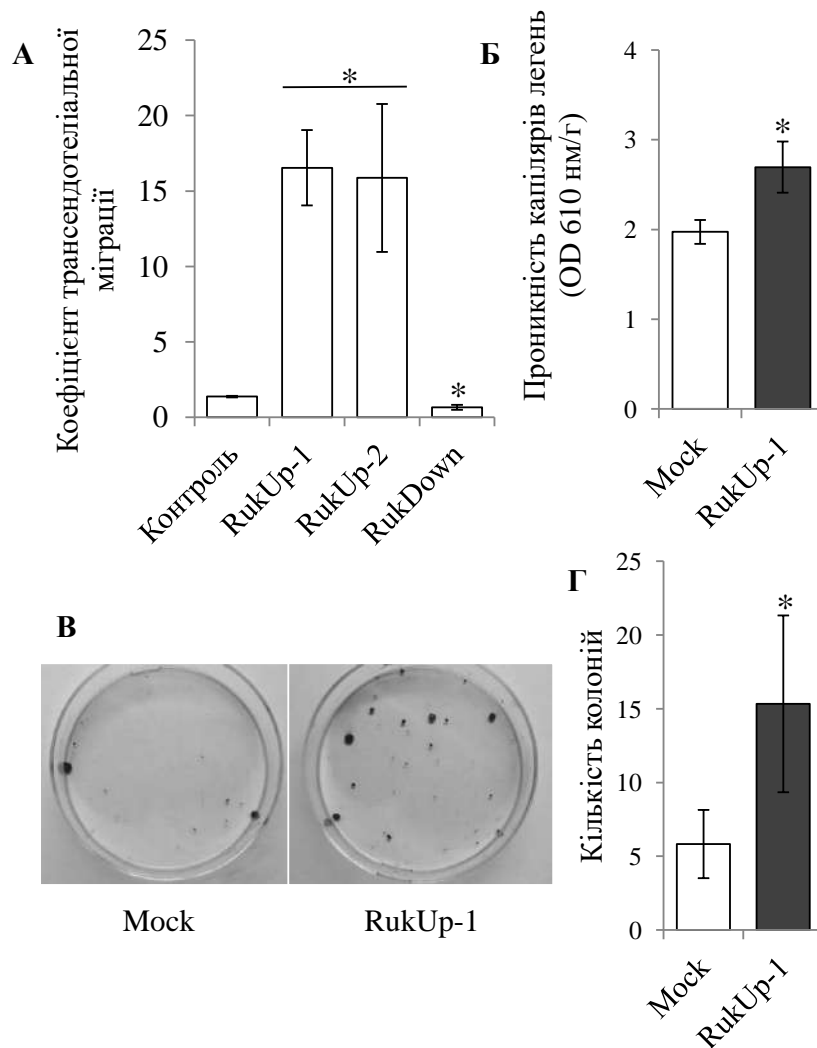


Рис. 3.22 Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням екстравазування. А – Коефіцієнт трансендотеліальної міграції клітин з різним вмістом Ruk/CIN85. Б – проникність капілярів легені до барвника Evans Blue. В, Г – ступінь колонізації легені (В – зображення колоній, утворених клітинами досліджуваних субліній клітин 4T1, які промігрували в тканину легені, Г – кількість колоній, утворених клітинами 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85). * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=3$

Для оцінки ефективності метастазування клітин 4T1 з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85 на моделі експериментального метастазування, пухлинні клітини досліджуваних субліній вводили у хвостову вену 8-тижневим самкам мишей лінії Balb/c, і через 2 тижні після цього оцінювали кількість поверхневих метастазів у легенях тварин і морфологічні зміни у структурі легенів. Було встановлено, що клітини 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85 утворюють достовірно більшу кількість метастазів у легені, у порівнянні з контролем, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 супроводжувався практично повною втратою здатності до метастазування (рис. 3.23, А, Б). Морфологічний аналіз зразків легені показав, що у контрольних зразках (групи Mock і Scr) присутні солідні метастази, а також ознаки інвазії у просвіт судин. Легені тварин з групи RukUp-1 були практично повністю заміщені пухлинними клітинами, часто спостерігали інвазію в кровоносні судини. У тварин групи RukDown легені переважно зберігали нормальну структуру, рідко виявляли поодинокі мікрометастази (рис. 3.23, В). При морфологічному аналізі оцінювали також ступінь інфільтрації легенів пухлинними клітинами, і отримали наступний розподіл: група Mock - ++, RukUp-1 - +++++, Scr - ++, RukDown - +.

Оскільки, що для «хоумінгу» в органи-мішені та формування вторинних вогнищ пухлинного росту (метастазів), в пухлинних клітинах індукується мезенхімно-епітелієвий перехід (MET) – процес, обернений до ЕМТ, який характеризується індукуванням молекул адгезії, зростанням рівня диференціювання клітин, а також посиленням проліферації. Для оцінки проліферативної активності пухлинних клітин лінії 4T1 з різним вмістом Ruk/CIN85 в межах легеневих метастазів, аналізували вміст антигена проліферації Ki67 в ядрах клітин. Було встановлено, що у зразках легені групи RukUp-1 відсоток Ki67-позитивних клітин був достовірно вищим, ніж у контролі, тоді як в групі RukDown цей показник достовірно знижувався (рис. 3.24), що може свідчити про індукцію MET в клітинах 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85, які метастазували в легені.

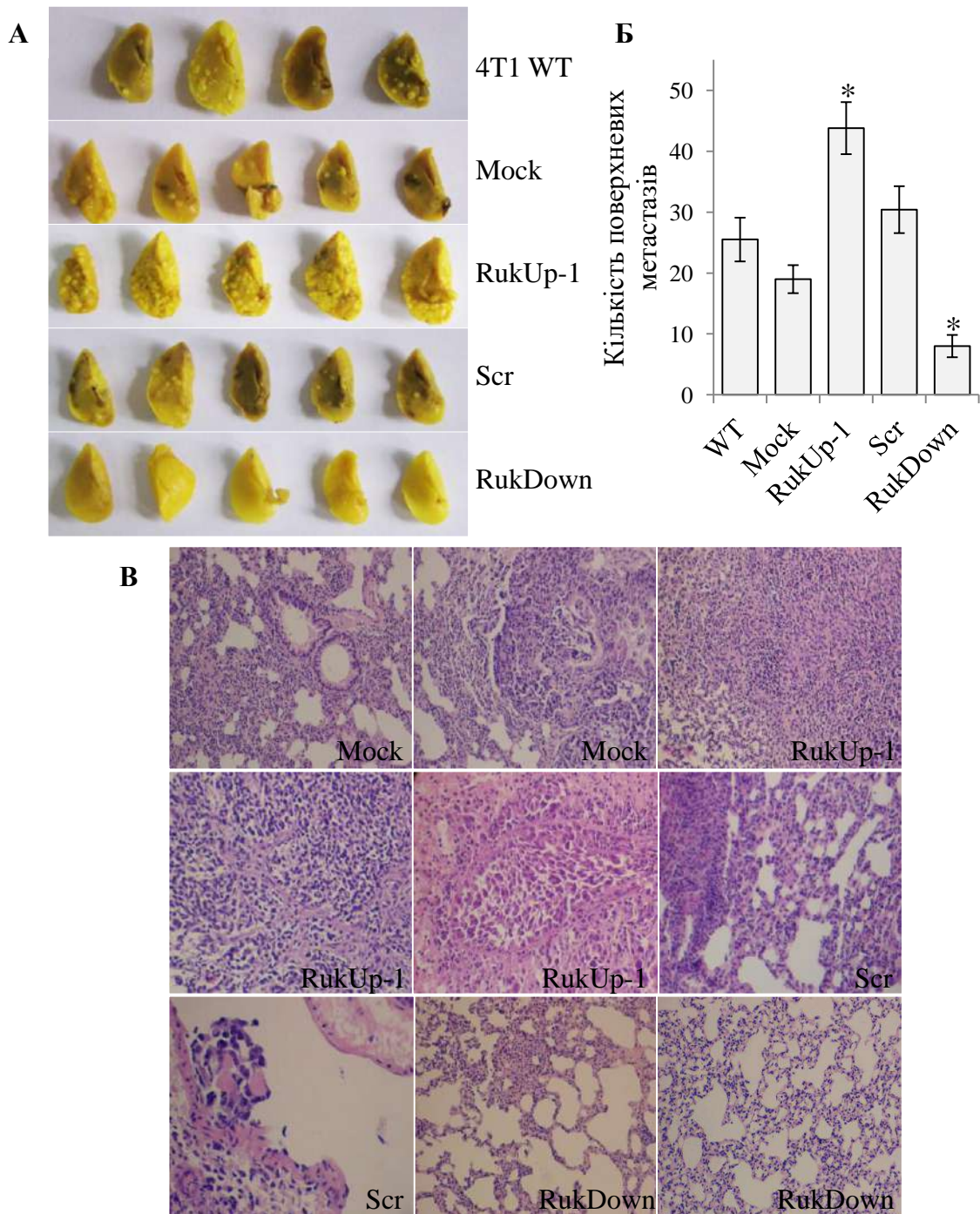


Рис. 3.23 Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 веде до зростання ефективності метастазування в легені на моделі експериментального метастазування. А – зображення зразків правої легені тварин досліджуваних груп, фіксованих розчином Буена. Б – кількість поверхневих метастазів. В – морфологічний аналіз легенів тварин досліджуваних груп. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=5$

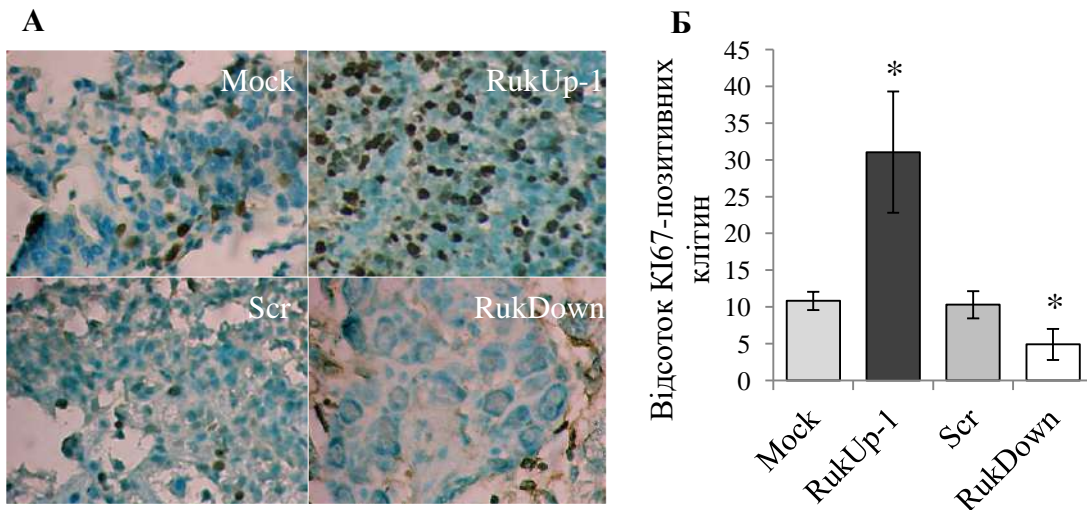


Рис. 3.24 Вміст ядерного фактора проліферації Кі-67 у клітинах легневих метастазів. А – репрезентативні зображення препаратів, Б – відсоток Кі67-позитивних клітин. * - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідним контролем, $n=5$

В даній дисертаційній роботі на моделі клітин раку грудної залози було вперше продемонстровано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується зростанням ефективності екстравазування та метастазування клітин лінії 4T1 *in vivo*, тоді як пригнічення експресії Ruk/CIN85 веде до значного зниження темпів екстравазування та практично повної втрати здатності до метастазування. Подібні результати були одержані і на моделі меланоми миші лінії B16: пригнічення експресії Ruk/CIN85 за допомогою shRNA вело до зниження як рухливості та інвазивності *in vitro*, так і до практично повного пригнічення метастазування в легені *in vivo* [227]. Також, аналіз зразків первинних пухлин людини демонструє, що вміст Ruk/CIN85 у пухлинних тканинах не лише вищий, аніж в нормальних тканинах, але й корелює з рівнем злоякісності пухлини. Так, на зразках раку простати людини показано, що вміст Ruk/CIN85 у пухлинах простати достовірно вищий, ніж у нормальній простаті, до того ж, вміст Ruk/CIN85 позитивно корелює з індексом Глісона (Gleason score) [87]. Аналіз зразків доброякісних та злоякісних новоутворень шкіри виявив підвищений

вміст Ruk/CIN85 у порівнянні з нормальними зразками, причому в злоякісно трансформованих зразках вміст Ruk/CIN85 був найвищим, і корелював з наявністю метастазів у лімфовузлах та дистантних метастазів [101]. На зразках недрібноклітинного раку голови та ший (HNSCC) продемонстровано, що підвищений рівень експресії мРНК Ruk/CIN85 корелює з наявністю метастазів у лімфовузлах та клінічною стадією розвитку пухлини [102]. Вміст Ruk/CIN85 виявився достовірно вищим у зразках карциноми шийки матки у порівнянні з нормальним епітелієм шийки матки, причому вищий вміст Ruk/CIN85 спостерігався в зразках з глибинною інвазією пухлини, порівняно з поверхневою інвазією [100].

Нами було продемонстровано, що при надекспресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 зростає вміст ядерного антигена проліферації Ki67 у легневих метастазах, тоді як проліферативна активність цих клітин у культурі, навпаки, знижується. В той же час, клітини з пригніченою експресією Ruk/CIN85 характеризуються підвищеною проліферацією в культурі клітин, тоді як у легневих метастазах, навпаки, знижується кількість Ki67-позитивних ядер. Таким чином, було виявлено різноспрямовані зміни в проліферативній активності у клітинах лінії 4T1 в культурі (і, ймовірно, первинній пухлині) і в метастазах. Для позначення генетичних, епігенетичних та метаболічних змін у пухлинній клітині, які відбуваються при переході від метастазування до «хоумінгу» в орган-мішень і формування нового центру пухлинного росту, використовують термін мезенхімно-епітелієвий перехід (MET). В результаті MET пухлинні клітини в зоні метастазування знову набувають епітелієвих ознак, в тому числі експресують E-кадгерин та інші маркери диференціювання, відновлюють проліферативну активність тощо [315, 316]. Аналіз Ki67 позитивних клітин у метастазах з раком грудної залози показав, що високий індекс Ki67 у метастазах корелює з високим рівнем смертності пацієнтів. Також, було виявлено, що зміна індексу Ki67 з високого у первинній пухлині на низький у метастазах є маркером кращої виживаності пацієнтів [317].

У підсумку, підвищений рівень експресії/вміст адаптерного протеїну Ruk/CIN85 є ознакою злоякісно трансформованих клітин, а зростання експресії цього адаптера у пухлинних клітинах супроводжується посиленням метастазуванням і є ознакою поганого прогнозу. Узагальнена схема участі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі біологічних відповідей клітини представлена на рис. 3.25.

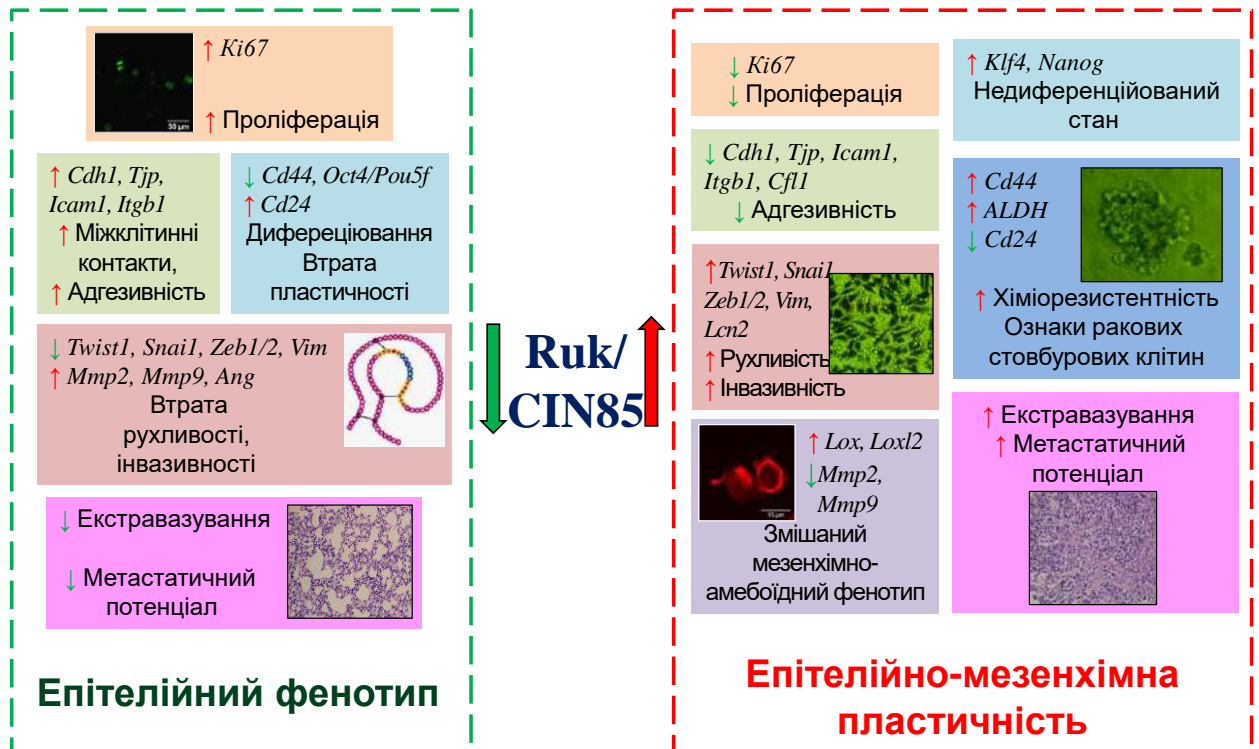


Рис. 3.25 Участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі проліферації, адгезії, міграції, інвазії та метастазування пухлинних клітин.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Рак грудної залози займає лідируючі позиції за смертністю серед інших онкологічних захворювань. Основними причинами високого рівня смертності є метастазування і набуття стійкості до хіміотерапії. На сьогодні відомо, що в основі інвазивності та метастазування пухлинних клітин лежить зворотний процес трансдиференціювання клітин, який супроводжується втратою міжклітинних контактів, апікально-базальної полярності, та набуттям витягнутої фібробластоподібної форми клітини, активацією ензимів ремоделювання позаклітинного матриксу, і, як наслідок, зростанням рухливості й інвазивності пухлинних клітин. Цей процес отримав назву епітелійно-мезенхімний перехід (EMT) [133, 134]. Індукторами EMT можуть бути TGF- β , WNT, NOTCH, сигнальні шляхи, залежні від РТК, інтегринів, цитокінів, гіпоксії [135]. У відповідь на сигналювання, залежне від індукторів EMT, в пухлинній клітині активуються транскрипційні фактори – регулятори EMT, до яких належать SNAIL, TWIST і ZEB [133]. Ці транскрипційні фактори пригнічують експресію «епітелійних» генів, наприклад, E-кадгерину, і активують експресію «мезенхімних» генів, наприклад, віментину, що й зумовлює зміни у функціональних властивостях пухлинної клітини. Розрізняють декілька типів міграції/інвазії клітин. За кількістю клітин, які мігрують, розрізняють індивідуальну і колективну міграцію. За способом міграції/інвазії – мезенхімну та амебоїдну. Клітини, що мігрують/інвазують за мезенхімним типом, мають витягнуту веретеноподібну форму і рухаються за рахунок розщеплення компонентів позаклітинного матриксу. В той же час, клітини, які мігрують за амебоїдним типом, мають округлу форму, та рухаються за незалежним від розщеплення позаклітинного матриксу механізмом. У відповідь на дію мікрооточення пухлинна клітина може змінювати тип міграції з мезенхімного на амебоїдний (мезенхімо-амебоїдний перехід, MAT) і навпаки (амебоїдно-мезенхімний перехід, AMT) [163, 166]. На молекулярному рівні MAT/MET переходи контролюються малими GTP-азами Rho, Rac та Cdc42 [166, 176]. В найбільш загальному розумінні, здатність

пухлинних клітин адаптуватись до умов мікрооточення, і вибір оптимальної стратегії поведінки, що передбачає епітелійно-мезенхімний перехід (EMT), мезенхімо-амебоїдний перехід (MAT), та мезенхімно-епітелійний перехід (MET), має назву епітелійно-мезенхімної пластичності [2].

Згідно з сучасними уявленнями, пухлини і культури пухлинних клітин є гетерогенними і складаються з субпопуляцій клітин, що відрізняються за своїми властивостями і ступенем диференціювання. Однією з таких субпопуляцій є ракові стовбурові клітини (Cancer stem cells, CSCs), що мають здатність до самовідтворення, характеризуються підвищеною туморогенністю, хіміо- і радіорезистентністю, здатністю до метастазування. Для CSCs є характерними низка властивостей – активація «ембріональних» сигнальних шляхів, експресія транскрипційних факторів, властивих для недиференційованих клітин, здатність проліферувати незалежно від підложки, експресія специфічних поверхневих маркерів [197]. Між проявом ознак CSCs і EMT існує взаємозв'язок: індукція EMT у нормальних іморталізованих епітеліоцитах веде до зростання кількості клітин, що володіють ознаками CSCs [200], тоді як індукція EMT у пухлинних клітинах супроводжується зростанням розмірів популяції CSCs та резистентності таких клітин до хіміотерапії [200, 201].

У зв'язку з цим, існує потреба пошуку молекулярних мішеней для впливу на клітини, що мають високоінвазивний мезенхімний/амебоїдний фенотип та проявляють ознаки ракових стовбурових клітин. Серед потенційних мішеней для скерованої протипухлинної терапії виділяють різноманітні компоненти сигнальних комплексів клітини: мембранні рецептори, ефекторні кінази, транскрипційні фактори, адаптерні протеїни.

Адаптери – це протеїни модульної будови, які забезпечують збирання сигнальних комплексів, регулюють, скеровують та полегшують внутрішньоклітинне сигналювання. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 (Regulator for ubiquitous kinase/Cbl-interacting protein of 85 kDa) складається з трьох SH3 доменів (A, B і C) на N-кінці, збагаченого на пролін району та

надспіралізованого домену на С-кінці [61]. Шляхом взаємодії з протеїнами-партнерами (яких на сьогодні відомо понад 300) Ruk/CIN85 бере участь у таких процесах як ендоцитоз активованих рецепторних тирозинкіназ, організація і біогенез елементів цитоскелету, адгезія, інвазія, апоптоз тощо [58, 61]. Раніше було показано, що первинні пухлини грудної залози людини характеризуються підвищеною експресією Ruk/CIN85 у порівнянні з умовно нормальною оточуючою тканиною, особливо в зонах інвазії та метастазування, а високий рівень експресії Ruk/CIN85 корелює з пізніми стадіями розвитку пухлини і поганим прогнозом [8]. Водночас, молекулярні механізми залучення цього адаптерного протеїну до процесів міграції, інвазії й метастазування вивчені недостатньо.

Для дослідження ролі адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі міграції й інвазії пухлинних клітин нами було використано сублінії клітин аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією (сублінії RukUp-1, RukUp-2) і зниженою експресією (сублінія RukDown) Ruk/CIN85.

Проліферативний потенціал одержаних субліній оцінювали шляхом прямого підрахунку, за допомогою МТТ-тесту і за кількістю Кі67-позитивних клітин, і показали, що рівень експресії Ruk/CIN85 у сублініях клітин 4T1 негативно корелює з їх проліферативним потенціалом. Також було встановлено негативну залежність між експресією Ruk/CIN85 і адгезивністю клітин 4T1. Дослідження міграції за допомогою тесту на заростання «подряпини» і інвазії за допомогою модифікованої камери Бойдена показало, що при надекспресії Ruk/CIN85 достовірно зростають як рухливість, так і інвазивність через Матригель, колаген 1 типу і фібронектин клітин 4T1, тоді як при пригніченні експресії Ruk/CIN85 як рухливість, так і інвазивність достовірно знижуються. Таким чином, нами продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до контролю проліферації, адгезивності, рухливості та інвазії клітин раку грудної залози і, ймовірно,

служує «перемикачем» між проліферативним та інвазивним станами пухлинної клітини [224].

Експресію генів, асоційованих з ЕМТ, оцінювали методами кількісної ПЛІР, Вестерн-блот аналізу та флуоресцентної конфокальної мікроскопії. Було встановлено, що у клітинах 4Т1 з надекспресією Ruk/CIN85 зростають рівні експресії ключових регуляторів ЕМТ – транскрипційних факторів Snail, Twist1, Zeb1 і Zeb2, а також мезенхімного маркера віментину. Тоді як у клітинах сублінії RukDown рівні експресії Snail, Twist1, Zeb1, Zeb2 та віментину достовірно знижуються, проте зростає експресія епітелійного маркера Е-кадгерину. Також було проаналізовано рівні експресії молекул адгезії (Tgfb1, Icam1, Tjp, Itgb1, Fn1, Cfl1), запалення (Lcn-2, Il-2, Il-6, Tnf, Ccl2, Cxcl5), та деградації позаклітинного матриксу (Mmp2, Mmp9, Mmp13, Mmp14, Ctsd, Plau, Plaur, Serpine1) у клітинах 4Т1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85. Виявлено негативну кореляцію між рівнем експресії Ruk/CIN85 і експресією молекул адгезії – Tjp, Icam1, Itgb1, Cfl1, що співвідноситься з адгезивністю досліджуваних субліній клітин 4Т1. Серед молекул запалення та імунної відповіді виявлено позитивний зв'язок рівня експресії Ruk/CIN85 з Lcn-2, Il-2, Il-6, і негативний – з Tnf, Ccl2, Cxcl5. Аналіз експресії ензимів деградації ЕСМ свідчить про зниження експресії позаклітинних протеїназ (особливо MMP-2 і MMP-9) у клітинах RukUp-1 і зростання їх експресії в клітинах RukDown. Таким чином, результати профілювання генів, асоційованих з ЕМТ, дозволили вперше продемонструвати здатність адаптерного протеїну Ruk/CIN85 контролювати епітелійно-мезенхімну пластичність залежно від рівня його експресії в пухлинних клітинах.

Активність матриксних металопротеїназ MMP-2 і MMP-9 оцінювали методом желатинової зимографії і показали, що активність цих ензимів зростає в клітинах RukDown і знижується в клітинах RukUp-1. Забарвлення актинового цитоскелету за допомогою TRITC-міченого фалоїдину дозволило виявити у клітинах сублінії RukUp-1 кортикальне актинове кільце і вип'ячування мембрани - «блеби». Також, виявили достовірне зростання як

рівня експресії, так і активності лізілоксидази у клітинах RukUp-1, та пригнічення експресії і активності цього ензиму в клітинах сублінії RukDown. Разом, ці результати демонструють ознаки амебоїдного типу міграції і наявність змішаного мезенхімно-амебоїдного фенотипу у клітин 4T1 з надекспресією Ruk/CIN85. За допомогою Вестерн-блот аналізу було виявлено фрагмент плазміногену (ангіостатин) з молекулярною масою 50 кДа у лізатах клітин, причому найбільшу його кількість виявлено у клітинах сублінії RukDown, а в клітинах сублінії RukUp-1 ангіостатини майже не детектувались. Показано, що застосування ангіостатинів пригнічує інвазивність клітин 4T1 RukUp-1, тоді як інгібітор металопротеїназ GM6001 відновлює інвазивність клітин RukDown. Таким чином, матриксні металопротеїнази, ймовірно, пригнічують інвазивність клітин 4T1 шляхом продукування ангіостатинів.

Ступінь прояву ознак ракових стовбурових клітин оцінювали за експресією специфічних поверхневих маркерів CD44 і CD24 та генів репрограмування, здатністю формувати сфероїди, та хіміорезистентністю. Встановлено, що при надекспресії Ruk/CIN85 зростають рівні експресії CD44, Klf4, Nanog, і знижується - CD24, а за умов down-регулювання Ruk/CIN85 знижуються рівні експресії CD44, Oct4, і зростає - CD24. Дослідження здатності клітин 4T1 з різними рівнями експресії Ruk/CIN85 до формування сфероїдів показало, що клітини RukUp-1 формують достовірно більшу кількість сфероїдів, причому ця здатність зберігається протягом як мінімум 4 пасажів, а клітини RukDown, навпаки, характеризуються пригніченням сфероїдоутворювального потенціалу. Хіміорезистентність оцінювали за значеннями IC_{50} для доксорубіцину у досліджуваних сублініях клітин 4T1, за формуванням колоній у напіврідкому агарі за присутності доксорубіцину, і за активністю ензиму детоксикації ALDH. Встановлено, що при надекспресії Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 зростає IC_{50} для доксорубіцину, кількість доксорубіцин-резистентних колоній в напіврідкому агарі, та активність ALDH, а пригнічення експресії Ruk/CIN85, навпаки, супроводжується зниженням

хіміорезистентності. Отже, надекспресія Ruk/CIN85 у клітинах 4T1 супроводжується посиленням прояву ознак ракових стовбурових клітин.

Ефективність екстравазування *in vitro* оцінювали за допомогою трансендотеліальної міграції (ТЕМ). Показано, що ефективність ТЕМ для клітин RukUp-1 зростає у 15 разів, а для клітин сублінії RukDown, навпаки, знижується. На моделі *in vivo* продемонстровано, що при надекспресії Ruk/CIN85 зростає проникність капілярів легені, та ступінь її колонізації, у порівнянні з контролем. На моделі експериментального метастазування встановлено, що у групі RukUp-1 достовірно зростає кількість поверхневих метастазів у легені, тоді як у групі RukDown метастази практично не виявляються. Морфологічний аналіз зразків легені підтвердив результати підрахунку метастазів. Так, легені тварин групи RukUp-1 виявляються макрومتастази, які заповнюють майже всю тканину легенів, спостерігаються ознаки інвазії в сусідні тканини і в судини, тоді як в групі RukDown легені зберігають практично нормальну структуру, виявляються лише поодинокі мікрومتастази. Одрезані результати демонструють, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 залучений до контролю екстравазування і метастазування клітин лінії 4T1. У клітинах легеневих метастазів оцінювали відсоток ядер, позитивних за антигеном проліферації Ki67, і встановили, що в групі RukUp-1 зростає відсоток Ki67-позитивних клітин, а в групі RukDown – знижується, що є свідченням того, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85, ймовірно, індукує мезенхімно-епітеліний перехід (MET) у пухлинних клітинах, які метастазували в легені.

ВИСНОВКИ

Проведено комплекс експериментальних робіт, які засвідчили участь адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у контролі епітелійно-мезенхімної пластичності на моделях *in vitro* та *in vivo*. Результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що високий рівень експресії Ruk/CIN85 в клітинах 4T1 призводить до розвитку високо агресивного, гібридного мезенхімно-амебоїдного фенотипу, тоді як пригнічення експресії адаптерного протеїна – до фіксування клітин 4T1 у гомогенному епітелійному стані і блокування епітелійно-мезенхімної пластичності.

1. Одержано сублінії аденокарциномних клітин грудної залози миші лінії 4T1 зі стабільною надекспресією та зниженою експресією повнорозмірної форми адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Виявлено залежність морфології клітин 4T1 від рівня експресії Ruk/CIN85 – округлення клітин RukUp та посилення епітелійного фенотипу клітин RukDown.

2. Встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми грудної залози миші лінії 4T1 супроводжується зниженням їх проліферативного потенціалу та адгезивності, а також посиленням рухливості й інвазивності. У клітинах лінії 4T1 з пригніченим рівнем експресії Ruk/CIN85 виявлено протилежно спрямовані зміни у проліферації, адгезивності, рухливості та інвазивності.

3. Вперше продемонстровано, що адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію низки генів, залучених до контролю процесів міграції та інвазії, в тому числі віментину, Е-кадгерину, транскрипційних факторів Twist1, Snai1, Zeb1/2, металопротеїназ MMP-2, MMP-9, і, в такий спосіб стимулює епітелійно-мезенхімний/амебоїдний перехід у клітинах 4T1 з надекспресією цього адаптера. Водночас, профілювання експресії генів показало, що клітини 4T1 з пригніченою експресією Ruk/CIN85 набувають ознак епітелійних клітин.

4. Вперше показано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується зниженням активності

металопротеїназ MMP-2 і MMP-9, тоді як у сублінії клітин 4T1 з down-регулюванням цього адаптера активність цих ензимів, навпаки, зростає. Вперше виявлено, що активація металопротеїназ супроводжується пригніченням інвазивності клітин 4T1 RukDown, ймовірно, за рахунок продукування ангіостатинів. Продемонстровано, що клітини з надекспресією Ruk/CIN85 характеризуються і іншими ознаками амебоїдного типу міграції: округла форма клітин, наявність кортикального актинового кільця та вип'ячувань мембрани, підвищена активність і експресія лізилоксидази.

5. Вперше встановлено, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням експресії генів, залучених до процесів репрограмування та підтримання недиференційованого стану клітини, а також посиленням прояву ознак ракових стовбурових клітин, таких як здатність до росту в неприкріпленому стані, самовідтворення, експресія специфічних поверхневих маркерів, підвищена резистентність до доксорубіцину. Водночас пригнічення експресії Ruk/CIN85 зумовлює як втрату молекулярних маркерів CSCs, так і пригнічення сфероїдоутворення.

6. Продемонстровано, що надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням їх здатності до екстравазування в легені. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах лінії 4T1 супроводжується посиленням їх здатності до метастазування, тоді як down-регулювання Ruk/CIN85, навпаки, веде до практично повного пригнічення цього процесу. Встановлено, що в легневих метастазах Ruk/CIN85 індукує мезенхімно-епітелійний перехід, асоційований з посиленням проліферативної активності пухлинних клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Friedl P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:14-23.
2. Ye X, Weinberg RA. Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol.* 2015;25(11):675-686.
3. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-92.
4. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer cell.* 2012;22:725–736.
5. Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol.* 2010;188:11-19.
6. Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5818-23.
7. Langeberg LK, Scott JD. Signalling scaffolds and local organization of cellular behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(4):232-244.
8. Samoylenko A, Vynnytska-Myronovska B, Byts N, Kozlova N, Basaraba O, Pasichnyk G, Palyvoda K, Bobak Y, Barska M, Mayevska O, Rzhepetsky Y, Shuvayeva H, Lyzogubov V, Usenko V, Savran V, Volodko N, Buchman V, Kietzmann T, Drobot L. Increased levels of the HER1 adaptor protein Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy. *Carcinogenesis.* 2012; 33: 1976-1984.
9. Pawson T, Scott JD. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science.* 1997;278(5346):2075-2080.
10. Pawson T. Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):112-116.
11. Scott JD, Pawson T. Cell communication: the inside story. *Sci Am.* 2000;282(6):72-79.

12. Huang L, Watanabe M, Chikamori M, Kido Y, Yamamoto T, Shibuya M, Gotoh N, Tsuchida N. Unique role of SNT-2/FRS2beta/FRS3 docking/adaptor protein for negative regulation in EGF receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Oncogene*. 2006;25(49):6457-6466.
13. Villalobo A, Ishida H, Vogel HJ, Berchtold MW. Calmodulin as a protein linker and a regulator of adaptor/scaffold proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018;1865(3):507-521.
14. Buday L, Tompa P. Functional classification of scaffold proteins and related molecules. *FEBS J*. 2010;277(21):4348-4355.
15. Rajakulendran T, Sahmi M, Lefrançois M, Sicheri F, Therrien M. A dimerization-dependent mechanism drives RAF catalytic activation. *Nature*. 2009;461(7263):542-545.
16. Good MC, Zalatan JG, Lim WA. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*. 2011;332(6030):680-686.
17. Alexa A, Varga J, Reményi A. Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules. *FEBS J*. 2010;277(21):4376-4382.
18. Shaw AS, Filbert EL. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:47-56.
19. Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ. Docking proteins. *FEBS J*. 2010;277:4356-4369.
20. Lorene K, Langeberg, John D. Scott. A-kinase-anchoring proteins. *J Cell Sci*. 2005;118:3217-3220.
21. Logue JS, Scott JD. Organizing signal transduction through A-kinase anchoring proteins (AKAPs). *FEBS J*. 2010;277(21):4370-4375.
22. Lowenstein EJ, Daly RJ, Batzer AG, Li W, Margolis B, Lammers R, Ullrich A, Skolnik EY, Bar-Sagi D, Schlessinger J. The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling" *Cell*. 1992;70(3):431-442.
23. Desgrosellier JS, Cheresch DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(1):9-22.

24. Chan KT, Cortesio CL, Huttenlocher A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol.* 2009;185(2):357-370.
25. Guerrero MS, Parsons JT, Bouton AH. Cas and NEDD9 Contribute to Tumor Progression through Dynamic Regulation of the Cytoskeleton. *Genes Cancer.* 2012;3(5-6):371-381.
26. Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, Bouton AH. Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. *Mol Cell Biol.* 2000;20:5865-5878.
27. Brabek J, Constancio SS, Shin NY, Pozzi A, Weaver AM, Hanks SK. CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells. *Oncogene.* 2004;23:7406-7415.
28. Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;33(3):122-128.
29. Dehm SM, Bonham K. SRC gene expression in human cancer: the role of transcriptional activation. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(2):263–274.
30. Vega FM, Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 2008;582:2093-2101.
31. Tornillo G, Defilippi P, Cabodi S. Cas proteins: dodgy scaffolding in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16(5):443.
32. Sima N, Cheng X, Ye F, Ma D, Xie X, Lü W. The overexpression of scaffolding protein NEDD9 promotes migration and invasion in cervical cancer via tyrosine phosphorylated FAK and SRC. *PLoS One.* 2013;8(9):e74594.
33. Chang JX, Gao F, Zhao GQ, Zhang GJ. Expression and clinical significance of NEDD9 in lung tissues. *Med Oncol.* 2012;29(4):2654-2660.
34. Miao Y, Li AL, Wang L, Fan CF, Zhang XP, Xu HT, Yang LH, Liu Y, Wang EH. Overexpression of NEDD9 is associated with altered expression of E-Cadherin, β -Catenin and N-Cadherin and predictive of poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res.* 2013;19(2):281-286.

35. Wang J, Wang S, Luan Y, Zhang W, Sun C, Cheng G, Li K, Xin Q, Lin Z, Qi T, Kong F. Overexpression of NEDD9 in renal cell carcinoma is associated with tumor migration and invasion. *Oncol Lett.* 2017;14(6):8021-8027.
36. Cabodi S, Moro L, Baj G, Smeriglio M, Di Stefano P, Gippone S, Surico N, Silengo L, Turco E, Tarone G, Defilippi P. p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 8):1603-1611.
37. Cabodi S, Tinnirello A, Di Stefano P, Bisarò B, Ambrosino E, Castellano I, Sapino A, Arisio R, Cavallo F, Forni G, Glukhova M, Silengo L, Altruda F, Turco E, Tarone G, Defilippi P. p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis. *Cancer Res.* 2006;66(9):4672-4680.
38. Cross AM, Wilson AL, Guerrero MS, Thomas KS, Bachir AI, Kubow KE, Horwitz AR, Bouton AH. Breast cancer antiestrogen resistance 3-p130^{Cas} interactions promote adhesion disassembly and invasion in breast cancer cells. *Oncogene.* 2016;35(45):5850-5859.
39. Fromont G, Cussenot O. The integrin signalling adaptor p130CAS is also a key player in prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(3):227.
40. Zhang XA, He B, Zhou B, Liu L. Requirement of the p130^{CAS}-Crk coupling for metastasis suppressor KAI1/CD82-mediated inhibition of cell migration. *J Biol Chem.* 2003;18:27319-27328.
41. Chang Y, Bai L, Liu S, Yang JC, Kung HJ, Evans CP. Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530. *Oncogene.* 2006;27:6365-6375.
42. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3279-3290.
43. Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal.* 2008;21(4):462-469.
44. Giubellino A, Burke TR, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(8):1021-1033.

45. Huebner K, Kastury K, Druck T, Salcini AE, Lanfrancone L, Pelicci G. Chromosome locations of genes encoding human signal transduction adapter proteins, Nck (NCK), Shc (SHC1), and Grb2 (GRB2). *Genomics*. 1994;22(2):281–287.
46. Kapoor S. Grb2 and its influence on tumor growth and progression in systemic malignancies. *Acta Oncol*. 2014;53:157-158.
47. Daly RJ, Binder MD, Sutherland RL. Overexpression of the Grb2 gene in human breast cancer cell lines. *Oncogene*. 1994;9(9):2723–2727.
48. Watanabe T, Shinohara N, Moriya K, Sazawa A, Kobayashi Y, Ogiso Y. Significance of the Grb2 and son of sevenless (SOS) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB Life*. 2000;49(4):317–320.
49. Misra UK, Pizzo SV. Potentiation of signal transduction mitogenesis and cellular proliferation upon binding of receptor-recognized forms of alpha-2-macroglobulin to 1-LN prostate cancer cells. *Cellular Signalling*. 2004;16(4):487–496.
50. Giubellino A, Gao Y, Lee S, Lee MJ, Vasselli JR, Medepalli S. Inhibition of tumor metastasis by a growth factor receptor bound protein 2 Src homology 2 domain-binding antagonist. *Cancer Res*. 2007;67(13):6012–6016.
51. Kardinal C, Konkol B, Lin H, Eulitz M, Schmidt EK, Estrov Z. Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-SoS complexes. *Blood*. 2001;98(6):1773–1781.
52. Feller SM, Tuchscherer G, Voss J. High affinity molecules disrupting GRB2 protein complexes as a therapeutic strategy for chronic myelogenous leukaemia. *Leukemia and Lymphoma*. 2003;44(3):411–427.
53. Neilsen BK, Frodyma DE, Lewis RE, Fisher KW. KSR as a therapeutic target for Ras-dependent cancers. *Expert Opin Ther Targets*. 2017;21(5):499-509.
54. Kortum RL, Lewis RE. The molecular scaffold KSR1 regulates the proliferative and oncogenic potential of cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24:4407–4416.
55. Fisher KW, Das B, Kim HS, Clymer BK, Gehring D, Smith DR, Costanzo-Garvey DL, Fernandez MR, Brattain MG, Kelly DL, MacMillan J, White MA,

- Lewis RE. AMPK promotes aberrant PGC1 β expression to support human colon tumor cell survival. *Mol Cell Biol.* 2015;35:3866–3879.
56. Fisher KW, Das B, Kortum RL, Chaika OV, Lewis RE. Kinase suppressor of ras 1 (KSR1) regulates PGC1 α and estrogen-related receptor α to promote oncogenic Ras-dependent anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol.* 2011;31(12):2453-2461.
57. Zhang J, Zafrullah M, Yang X, Yin X, Zhang Z, Fuks Z, Kolesnick R. Downregulation of KSR1 in pancreatic cancer xenografts by antisense oligonucleotide correlates with tumor drug uptake. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(9):1490-1495.
58. Dikic I. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett.* 2002;529(1):110-115.
59. Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature.* 2002;416(6877):183-187.
60. Gout I, Middleton G, Adu J, Ninkina NN, Drobot LB, Filonenko V, Matsuka G, Davies AM, Waterfield M, Buchman VL. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *The EMBO Journal.* 2000;19(15):4015-4025.
61. Havrylov S, Redowicz MJ, Buchman VL. Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic.* 2010;11(6):721-731.
62. Bogler O, Furnari FB, Kindler-Roehrborn A, Sykes VW, Yung R, Huang H-JS, Cavenee WK. SETA: a novel SH3 domain-containing adapter molecule associated with malignancy in astrocytes. *Neuro Oncol.* 2000;2:6-15.
63. Tibaldi EV, Reinherz EL. CD2BP3, CIN85 and the structurally related adaptor protein CMS bind to the same CD2 cytoplasmic segment, but elicit divergent functional activities. *Int Immunol* 2003;15:313–329.
64. Buchman VL, Luke C, Borthwick EB, Gout I, Ninkina N. Organization of the mouse Ruk locus and expression of isoforms in mouse tissues. *Gene.* 2002;295(1):13–17.

65. Vynnytska-Myronovska BO, Bobak YP, Pasichnyk GV, Igmentseva NI, Samoylenko AA, Drobot LB. Multiple molecular forms of adaptor protein Ruk/CIN85 specifically associate with different subcellular compartments in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Ukr Biochem J*. 2014;86(5):102-110.
66. Bian M, Yu M, Yang S, Gao H, Huang Y, Deng C, Gao Y, Sun F, Huang F. Expression of Cbl-interacting protein of 85 kDa in MPTP mouse model of Parkinson's disease and 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-treated dopaminergic SH-SY5Y cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(6):505-512.
67. Teng B, Schroder P, Müller-Deile J, Schenk H, Staggs L, Tossidou I, Dikic I, Haller H, Schiffer M. CIN85 Deficiency Prevents Nephrin Endocytosis and Proteinuria in Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(12):3667-3679.
68. Kowanetz K, Szymkiewicz I, Haglund K, Kowanetz M, Husnjak K, Taylor JD, Soubeyran P, Engstrom U, Ladbury JE, Dikic I. Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* 2003;278:39735–39746.
69. Watanabe S, Take H, Takeda K, Yu ZX, Iwata N, Kajigaya S. Characterization of the CIN85 adaptor protein and identification of components involved in CIN85 complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:167–174.
70. Gaidos G, Soni S, Oswald DJ, Toselli PA, Kirsch KH. Structure and function analysis of the CMS/CIN85 protein family identifies actin-bundling properties and heterotypic-complex formation. *J Cell Sci* 2007;120:2366–2377.
71. Zhang J, Zheng X, Yang X, Liao K. CIN85 associates with endosomal membrane and binds phosphatidic acid. *Cell Res* 2009;19:733–746.
72. Havrylov S, Rzhpetsky Y, Malinowska A, Drobot L, Redowicz MJ. Proteins recruited by SH3 domains of Ruk/CIN85 adaptor identified by LC-MS/MS. *Proteome Sci*. 2009;7:21.
73. Take H, Watanabe S, Takeda K, Yu ZX, Iwata N, Kajigaya S. Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85, that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268:321–328.

74. Szymkiewicz I, Kowanetz K, Soubeyran P, Dinarina A, Lipkowitz S, Dikic I. CIN85 participates in Cbl-b-mediated down-regulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 2002;277:39666–39672.
75. Dikic I. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1178–1181.
76. Kowanetz K, Husnjak K, Höller D, Kowanetz M, Soubeyran P, Hirsch D, Schmidt MHH, Pavelic K, De Camilli P, Randazzo PA, Dikic I. CIN85 associates with multiple effectors controlling intracellular trafficking of epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Cell*. 2004;15(7):3155-3166.
77. Zheng X, Zhang J, Liao K. The basic amino acids in the coiled-coil domain of CIN85 regulate its interaction with c-Cbl and phosphatidic acid during epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytosis. *BMC Biochem*. 2014;15:13.
78. Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, Dikic I. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12191-12196.
79. Rønning SB, Pedersen NM, Madshus IH, Stang E. CIN85 regulates ubiquitination and degradative endosomal sorting of the EGF receptor. *Exp Cell Res*. 2011;317(13):1804-1816.
80. Shimokawa N, Haglund K, Höltter SM, Grabbe C, Kirkin V, Koibuchi N, Schultz C, Rozman J, Hoeller D, Qiu CH, Londoño MB, Ikezawa J, Jedlicka P, Stein B, Schwarzacher SW, Wolfer DP, Ehrhardt N, Heuchel R, Nezis I, Brech A, Schmidt MHH, Fuchs H, Gailus-Durner V, Klingenspor M, Bogler O, Wurst W, Deller T, de Angelis MH, Dikic I. CIN85 regulates dopamine receptor endocytosis and governs behaviour in mice. *EMBO J*. 2010;29(14):2421-2432.
81. Molfetta R, Belleudi F, Peruzzi G, Morrone S, Leone L, Dikic I, Piccoli M, Frati L, Torrisi MR, Santoni A, Paolini R. CIN85 regulates the ligand-dependent endocytosis of the IgE receptor: a new molecular mechanism to dampen mast cell function. *J Immunol*. 2005;175(7):4208-4216.

82. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*. 2002;416:187–190.
83. Haglund K, Schmidt MH, Wong ES, Guy GR, Dikic I. Sprouty2 acts at the Cbl/CIN85 interface to inhibit epidermal growth factor receptor downregulation. *EMBO Rep*. 2005;6:635–641.
84. Kowanetz K, Terzic J, Dikic I. Dab2 links CIN85 with clathrin-mediated receptor internalization. *FEBS Lett*. 2003;554:81–87.
85. Schmidt MH, Hoeller D, Yu J, Furnari FB, Cavenee WK, Dikic I, Bogler O. Alix/AIP1 antagonizes epidermal growth factor receptor downregulation by the Cbl-SETA/CIN85 complex. *Mol Cell Biol*. 2004;24:8981–8993.
86. Borthwick EB, Korobko IV, Luke C, Drel VR, Fedyshyn YY, Ninkina NN, Drobot LB, Buchman VL. Multiple Domains of Ruk/CIN85/SETA/CD2BP3 are Involved in Interaction with p85 α Regulatory Subunit of PI 3-kinase. *Journal of Molecular Biology*. 2004;343(4):1135–1146.
87. Yakymovych I, Yakymovych M, Zang G, Mu Y, Bergh A Landström M, Heldin CH. CIN85 modulates TGF β signaling by promoting the presentation of TGF β receptors on the cell surface. *The Journal of cell biology*. 2015;210(2):319-332.
88. Lynch DK, Winata SC, Lyons RJ, Hughes WE, Lehrbach GM, Wasinger V, Corthals G, Cordwell S, Daly RJ. A Cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2003;278:21805–21813.
89. Hutchings NJ, Clarkson N, Chalkley R, Barclay AN, Brown MH. Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J Biol Chem*. 2003;278:22396–22403.
90. Sato Y, Taoka M, Sugiyama N, Kubo K, Fuchigami T, Asada A, Saito T, Nakajima K, Isobe T, Hisanaga S. Regulation of the interaction of Disabled-1 with CIN85 by phosphorylation with Cyclin-dependent kinase 5. *Genes Cells*. 2007;12(12):1315-1327.

91. Schmidt MH, Chen B, Randazzo LM, Bogler O. SETA/CIN85/Ruk and its binding partner AIP1 associate with diverse cytoskeletal elements, including FAKs, and modulate cell adhesion. *J Cell Sci.* 2003;116:2845–2855.
92. Schmidt MH, Dikic I, Bogler O. Src phosphorylation of Alix/AIP1 modulates its interaction with binding partners and antagonizes its activities. *J Biol Chem.* 2005;280:3414–3425.
93. Johnson RI, Seppa MJ, Cagan RL. The *Drosophila* CD2AP/CIN85 orthologue Cindr regulates junctions and cytoskeleton dynamics during tissue patterning. *J Cell Biol.* 2008;180(6):1191-1204.
94. Narita T, Nishimura T, Yoshizaki K, Taniyama T. CIN85 associates with TNF receptor 1 via Src and modulates TNF-alpha-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2005;304(1):256-264.
95. Aissouni Y, Zapart G, Iovanna JL, Dikic I, Soubeyran P. CIN85 regulates the ability of MEKK4 to activate the p38 MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(2):808-814.
96. Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci.* 2008;5(1):44-51.
97. Phong MS, Van Horn RD, Li S, Tucker-Kellogg G, Surana U, Ye XS. p38 mitogen-activated protein kinase promotes cell survival in response to DNA damage but is not required for the G(2) DNA damage checkpoint in human cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2010;30(15):3816-3826.
98. Kim J, Kang D, Sun BK, Kim JH, Song JJ. TRAIL/MEKK4/p38/HSP27/Akt survival network is biphasically modulated by the Src/CIN85/c-Cbl complex. *Cell Signal.* 2013;25(1):372-379.
99. Nam JM, Onodera Y, Mazaki Y, Miyoshi H, Hashimoto S, Sabe H. CIN85, a Cbl-interacting protein, is a component of AMAP1-mediated breast cancer invasion machinery. *EMBO J.* 2007;26:647–656.
100. Ma Y, Ye F, Xie X, Zhou C, Lu W. Significance of PTPRZ1 and CIN85 expression in cervical carcinoma. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284(3):699-704.

101. Cascio S, Finn OJ. Complex of MUC1, CIN85 and Cbl in Colon Cancer Progression and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2015;7(1):342-352.
102. Wakasaki T, Masuda M, Niuro H, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Noda K, Taniyama T, Komune S, Akashi K. A critical role of c-Cbl-interacting protein of 85 kDa in the development and progression of head and neck squamous cell carcinomas through the ras-ERK pathway. *Neoplasia (New York, N.Y.)*. 2010;12(10):789-796.
103. Mayevska O, Shuvayeva H, Igmentseva N, Havrylov S, Basaraba O, Bobak Y, Barska M, Volod'ko N, Baranska J, Buchman V, Drobot L. Expression of adaptor protein Ruk/CIN85 isoforms in cell lines of various tissue origins and human melanoma. *Exp Oncol*. 2006;28(4):275-281.
104. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:83-92.
105. Henze AT, Acker T. Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle*. 2010;9(14):2749-2763.
106. Samoylenko A, Dimova E, Kozlova N, Drobot L, Kietzmann T. The adaptor protein Ruk/CIN85 activates plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression via hypoxia-inducible factor-1 α . *Thrombosis and Haemostasis*. 2010;103(05):901–909.
107. Kozlova N, Mennerich D, Samoylenko A, Dimova EY, Koivunen P, Biterova E, Richter K, Hassinen A, Kellokumpu S, Manninen A, Miinalainen I, Glumoff V, Ruddock L, Drobot L, Kietzmann T. The pro-oncogenic adaptor CIN85 inhibits hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-2. *Cancer Res*. 2019; pii: canres.3852.2018.
108. Pinsky DJ, Liao H, Lawson CA, Yan SF, Chen J, Carmeliet P, Loskutoff DJ, Stern DM. Coordinated induction of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and inhibition of plasminogen activator gene expression by hypoxia promotes pulmonary vascular fibrin deposition. *J Clin Invest*. 1998;102:919–928.
109. Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel

- tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost.* 2004;91:450–456.
110. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research.* 2010;70:5649–5669.
 111. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell.* 2017;168(4):670-691.
 112. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer.* 2002;2:442–454.
 113. Labelle M, Hynes RO. The initial hours of metastasis: the importance of cooperative host-tumor cell interactions during hematogenous dissemination. *Cancer Discov.* 2012;2:1091–1099.
 114. Palumbo JS, Talmadge KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Hu Z, Barney KA, Degen JL. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood.* 2007;110:133–141.
 115. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer cell.* 2011;20:576–590.
 116. Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer cell.* 2013;24:130–137.
 117. Kohler S, Ullrich S, Richter U, Schumacher U. E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung. *British journal of cancer.* 2010;102:602–609.
 118. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2014;111:E3053–3061.

119. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Bourdeau F, Kubes P, Ferri L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3446–3458.
120. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer research*. 2010;70:6071–6082.
121. Reymond N, d’Agua BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2013;13:858–870.
122. Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, Massague J. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell*. 2008;133:66–77.
123. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC, Bos PD, Kim JY, Nadal C, Gomis RR, Manova-Todorova K, Massague J. Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 2007;446:765–770.
124. Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475:222–225.
125. Wolf MJ, Hoos A, Bauer J, Boettcher S, Knust M, Weber A, Simonavicius N, Schneider C, Lang M, Sturzl M, Croner RS, Konrad A, Manz MG, Moch H, Aguzzi A, van Loo G, Pasparakis M, Prinz M, Borsig L, Heikenwalder M. Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer cell*. 2012;22:91–105.
126. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer*. 2002;2:563–572.
127. Giancotti FG. Mechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. *Cell*. 2013;155:750–764.
128. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature reviews Cancer*. 2014;14:611–622.

129. Brabletz T. To differentiate or not - routes towards metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2012;12:425–436.
130. Del Pozo Martin Y, Park D, Ramachandran A, Ombrato L, Calvo F, Chakravarty P, Spencer-Dene B, Derzsi S, Hill CS, Sahai E, Malanchi I. Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization. *Cell Rep*. 2015;13:2456–2469.
131. Korpala M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, Celia-Terrassa T, Mercatali L, Khan Z, Goodarzi H, Hua Y, Wei Y, Hu G, Garcia BA, Ragoussis J, Amadori D, Harris AL, Kang Y. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature medicine*. 2011;17:1101–1108.
132. Ocana OH, Corcoles R, Fabra A, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S, Barrallo-Gimeno A, Cano A, Nieto MA. Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer cell*. 2012;22:709–724.
133. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*. 2016;11(1):28-39.
134. Nieto MA. Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*. 2013;342(6159):1234850.
135. Katsuno Y, Lamouille S and Derynck R. TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*. 2013;25:76–84.
136. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009;15(5):416-28.
137. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research*. 2007;7(19):9066-9076.

138. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, Teng SC, Wu KJ. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008;10(3):295-305.
139. Wei SC, Fattet L, Tsai JH, Guo Y, Pai VH, Majeski HE, Chen AC, Sah RL, Taylor SS, Engler AJ, Yang J. Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nature cell biology.* 2015;17(5):678-688.
140. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J and García De Herreros A. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2:84–89.
141. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D and van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell.* 2001;7:1267–1278.
142. Bax NAM, Pijnappels DA, van Oorschot AAM, Winter EM, de Vries AAF, van Tuyn J, Braun J, Maas S, Schalijs MJ, Atsma DE. Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15:2675–2683.
143. Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, Peinado H, Bolós V, Martínez FO, Reina M, Cano A, Fabre M, Vilaró S. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J.* 2006;394:449–457.
144. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, Van Roy F and Berx G. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:6566–6578.
145. Fang X, Cai Y, Liu J, Wang Z, Wu Q, Zhang Z, Yang CJ, Yuan L, Ouyang G. Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial–mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene.* 2011;30:4707–4720.

146. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004;117:927–939.
147. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci*. 2012;125:4417–4422.
148. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:15–33.
149. Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2012;13:767–779.
150. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Rev. Cancer*. 2013;13:97–110.
151. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(3):178-96.
152. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell*. 2011;145:1012–1022.
153. Haynes J, Srivastava J, Madson N, Wittmann T, Barber DL. Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Mol. Biol. Cell*. 2011;22:4750–4764.
154. Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:65–76.
155. Anastasiadis PZ, Reynolds AB. Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2001;13:604–610.
156. Nelson WJ. Remodeling epithelial cell organization: transitions between front-rear and apical-basal polarity. *Cold Spring Harb. Perspect Biol*. 2009;1:a000513.
157. Godde NJ, Galea RC, Elsum IA, Humbert PO. Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2010;15:149–168.
158. Marcucci F, Stassi G, De Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(5):311-325.

159. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302:1704-1709.
160. Cox EA, Sastry SK, Huttenlocher A. Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell*. 2001;12:265-277.
161. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev*. 2009;28:129-135.
162. Poincloux R, Collin O, Lizárraga F, Romao M, Debray M, Piel M, Chavrier P. Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2011;108:1943-1948.
163. Friedl P, Maaser K, Klein CE, Niggemann B, Krohne G, Zänker KS. Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-dimensional collagen lattices results in local matrix reorganization and shedding of alpha2 and beta1 integrins and CD44. *Cancer Res*. 1997;57:2061-2070.
164. Sanz-Moreno V, Marshall CJ. The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22:690-696.
165. Lorentzen A, Bamber J, Sadok A, Elson-Schwab I, Marshall CJ. An ezrin-rich, rigid uropod-like structure directs movement of amoeboid blebbing cells. *J Cell Sci*. 2011;124:1256-1267.
166. Panková K, Rösel D, Novotný M, Brábek J. The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*. 2009;67(1):63-71.
167. Friedl P, Zänker KS, Bröcker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech*. 1998; 43(5):369-378.
168. Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*. 1997; 385(6616):537-540.

169. Yumura S, Mori H, Fukui Y. Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J Cell Biol.* 1984;99:894–899.
170. Friedl P, Borgmann S, Bröcker EB. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the *Dictyostelium* paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol.* 2001;70:491–509.
171. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* 2003;5:711–719.
172. Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol.* 2006;16:1515–1523.
173. Rösel D, Brábek J, Tolde O, Mierke CT, Zitterbart DP, Raupach C, Bicanová K, Kollmannsberger P, Panková D, Vesely P, Folk P, Fabry B. Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res.* 2008;6:1410–1420.
174. Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Bröcker EB, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 2003;160:267–277.
175. Friedl P, Noble PB, Shields ED, Zänker KS. Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RA^{high} and CD45RO^{high} CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in three-dimensional collagen lattices. *Immunology.* 1994;82:617–624.
176. Parri M, Chiarugi P. Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal.* 2010;8:23.
177. Pinner S, Sahai E. PDK1 regulates cancer cell motility by antagonising inhibition of ROCK1 by RhoE. *Nat Cell Biol.* 2008;10:127–137.
178. Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A, Marshall CJ. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol.* 2008;18:1456–1465.

179. De WO, Nguyen QD, Van HL, Bracke M, Bruyneel E, Gespach C, Mareel M. Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac. *FASEB J.* 2004;18:1016–1018.
180. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell.* 2001;106:489–498.
181. Vial E, Sahai E, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell.* 2003;4:67–79.
182. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 2008;135:510–523.
183. Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 2010;8:629–642.
184. Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, Shibue T, Tischler V, Reinhardt F, Itzkovitz S, Noske A, Zurrer-Hardi U, Bell G, et al. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell.* 2012;148:1015–1028.
185. Yao D, Dai C, Peng S. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2011;9(12):1608-1620.
186. Schmidt EM, Lamprecht S, Blaj C, Schaaf C, Krebs S, Blum H, Hermeking H, Jung A, Kirchner T, Horst D. Targeting tumor cell plasticity by combined inhibition of NOTCH and MAPK signaling in colon cancer. *The Journal of experimental medicine.* 2018;215(6):1693-1708.
187. Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 2013;501(7467):328–337.
188. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730–737.
189. Katoh M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *Int J Oncol.* 2017;51(5):1357-1369.

190. Shiraiwa K, Matsuse M, Nakazawa Y, Ogi T, Suzuki K, Saenko VA, Xu S, Umezawa K, Yamashita S, Tsukamoto K, Mitsutake N. The JAK/STAT3 and NF- κ B signaling pathways regulate cancer stem cell properties in anaplastic thyroid cancer cells. *Thyroid*. 2019; doi: 10.1089/thy.2018.0212. [Epub ahead of print]
191. Tafani M, Perrone GA, Pucci B, Russo A, Bizzarri M, Mechanick JI, Carpi A, Russo MA. Reprogramming cancer cells in endocrine-related tumors: open issues. *Curr Med Chem*. 2014;21(9):1146-1151.
192. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci*. 2017;108(3):283-289.
193. Lee CH, Yu CC, Wang BY, Chang WW. Tumorsphere as an effective in vitro platform for screening anti-cancer stem cell drugs. *Oncotarget*. 2015;7(2):1215-1226.
194. Poli V, Fagnocchi L, Zippo A. Tumorigenic Cell Reprogramming and Cancer Plasticity: Interplay between Signaling, Microenvironment, and Epigenetics. *Stem Cells Int*. 2018;2018:4598195.
195. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol*. 2018; doi: 10.1002/jcp.27740. [Epub ahead of print]
196. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:18.
197. Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaya A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:16-27.
198. Palomeras S, Ruiz-Martínez S, Puig T. Targeting Breast Cancer Stem Cells to Overcome Treatment Resistance. *Molecules*. 2018;23(9):2193.
199. Crabtree JS, Miele L. Breast Cancer Stem Cells. *Biomedicines*. 2018;6(3):77.

200. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133:704–715.
201. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, Lander ES. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138:645–659.
202. Malanchi I, Santamaria-Martinez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*. 2012;481:85–89.
203. Oskarsson T, Acharyya S, Zhang XH, Vanharanta S, Tavazoie SF, Morris PG, Downey RJ, Manova-Todorova K, Brogi E, Massague J. Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature medicine*. 2011;17:867–874.
204. Li CM, Gocheva V, Oudin MJ, Bhutkar A, Wang SY, Date SR, Ng SR, Whittaker CA, Bronson RT, Snyder EL, Gertler FB, Jacks T. Foxa2 and Cdx2 cooperate with Nkx2-1 to inhibit lung adenocarcinoma metastasis. *Genes Dev*. 2015;29:1850–1862.
205. Winslow MM, Dayton TL, Verhaak RG, Kim-Kiselak C, Snyder EL, Feldser DM, Hubbard DD, DuPage MJ, Whittaker CA, Hoersch S, Yoon S, Crowley D, Bronson RT, Chiang DY, Meyerson M, Jacks T. Suppression of lung adenocarcinoma progression by Nkx2-1. *Nature*. 2011;473:101–104.
206. Oskarsson T, Batlle E, Massague J. Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell stem cell*. 2014;14:306–321.
207. Peitzsch C, Tyutyunnykova A, Pantel K, Dubrovska A. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Seminars in Cancer Biology*. 2017;44:10–24.
208. Ablett MP, Singh JK, Clarke RB. Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic? *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2104-2116.

209. Denisa L Dragu, Laura G Necula, Coralia Bleotu, Carmen C Diaconu, Mihaela Chivu-Economescu. Therapies targeting cancer stem cells: Current trends and future challenges. *World J Stem Cells*. 2015;7(9):1185–1201.
210. Guzyk MM, Tykhomyrov AA, Nedzvetsky VS, Prischepa IV, Grinenko TV, Yanitska LV, Kuchmerovska TM. Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitors Reduce Reactive Gliosis and Improve Angiostatin Levels in Retina of Diabetic Rats. *Neurochem Res*. 2016;41(10):2526-2537.
211. Самойленко АА, Биць НВ, Пасічник ГВ, Козлова НВ, Базалій АВ, Геращенко ДС, Шандренко СГ, Воротніков ОВ, Кітцман Т, Комісаренко СВ, Дробот ЛБ. Відповідь пухлинних клітин на пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 рекомбінантними лети вірусами. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(4):182-189.
212. Bazalii AV, Horak IR, Pasichnyk GV, Komisarenko SV, Drobot LB. Transcriptional regulation of NOX genes expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is modulated by adaptor protein Ruk/CIN85. *Ukr Biochem J*. 2016;88(1):119-125.
213. Tykhomyrov AA, Yusova EI, Diordieva SI, Corsa V, V, Grinenko TV. Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. *Biotechnol Acta*. 2013;6(1):86-96.
214. Gudkova OO, Latyshko NV, Zaitseva OV, Shandrenko SG. Purification procedure and assay for the activity of lysyl oxidase. *Ukr Biochem J*. 2018;90(5):98-105.
215. Häuselmann I, Roblek M, Protsyuk D, Huck V, Knopfova L, Grässle S, Bauer AT, Schneider SW, Borsig L. Monocyte Induction of E-Selectin-Mediated Endothelial Activation Releases VE-Cadherin Junctions to Promote Tumor Cell Extravasation in the Metastasis Cascade. *Cancer Res*. 2016;76(18):5302-5312.
216. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. 2001;2:Unit 20.2.
217. O'Neill PR, Castillo-Badillo JA, Meshik X, Kalyanaraman V, Melgarejo K, Gautam N. Membrane Flow Drives an Adhesion-Independent Amoeboid Cell Migration Mode. *Dev Cell*. 2018;46(1):9-22.e4.

218. Horak I, Drobot L, Borsig L, Knopfova L. Overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells is followed by increased migration rate and invasion potential. *Biopolymers and Cell*. 2018;34(4):284-291.
219. Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuzé M, Takaki T, Voituriez R, Piel M. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell*. 2015;160(4):659-672.
220. Morata-Tarifa C, Jiménez G, García MA, Entrena JM, Griñán-Lisón C, Aguilera M, Picon-Ruiz M, Marchal JA. Low adherent cancer cell subpopulations are enriched in tumorigenic and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition-induced cancer stem-like cells. *Sci Rep*. 2016;6:18772.
221. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 2003;21:1624–1636.
222. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Dobbeling U, Kobert N, Schaerer L. In vivos witching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*. 2008;68:650–656.
223. Anjomshoaa A, Lin YH, Black MA, McCall JL, Humar B, Song S, Fukuzawa R, Yoon HS, Holzmann B, Friederichs J, van Rij A, Thompson-Fawcett M, Reeve AE. Reduced expression of a gene proliferation signature is associated with enhanced malignancy in colon cancer. *British journal of cancer*. 2008;99(6):966-973.
224. Jerby L, Wolf L, Denkert C, Stein GY, Hilvo M, Oresic M, Geiger T, Ruppin E. Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer. *Cancer Res*. 2012;72(22):5712-5720.
225. Fedotov S, Iomin A. Migration and proliferation dichotomy in tumor-cell invasion. *Phys Rev Lett*. 2007;98:118101.
226. Hatzikirou H, Basanta D, Simon M, Schaller K, Deutsch A. 'Go or Grow': the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Math Med Biol* 2012;29:49–65.

227. Cascio S, Farkas AM, Hughey RP, Finn OJ. Altered glycosylation of MUC1 influences its association with CIN85: the role of this novel complex in cancer cell invasion and migration. *Oncotarget*. 2013;4(10):1686-1697.
228. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(6):470–480.
229. Palmer TD, Ashby WJ, Lewis JD, Zijlstra A. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(8):568-581.
230. Lou L, Yu Z, Wang Y, Wang S, Zhao Y. c-Src inhibitor selectively inhibits triple-negative breast cancer overexpressed Vimentin in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2018;109(5):1648-1659.
231. Mendez MG, Kojima S, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010;24(6):1838-1851.
232. Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget*. 2015;6(18):15966-15983.
233. Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, Mehta SV, Brahmabhatt BV, Shah MJ, Shukla SN, Shah PM. Cytokeratin and vimentin expression in breast cancer. *Int J Biol Markers*. 2009;24(1):38-46.
234. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, Okada S, Aishima S, Morita M, Maehara Y. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(5):739-746.
235. Jeschke U, Mylonas I, Kuhn C, Shabani N, Kunert-Keil C, Schindlbeck C, Gerber B, Friese K. Expression of E-cadherin in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive carcinomas, their lymph node metastases, their distant metastases, carcinomas with recurrence and in recurrence. *Anticancer Res*. 2007;27(4A):1969-1974.
236. Younis LK, El Sakka H, Haque I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2007;1(1):43-51.
237. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB, Patil AV. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci*. 2011;3(5):227-233.

238. Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, Gilles C. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*. 2017;11(7):805-823.
239. Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*. 2005;24(14):2375-2385.
240. Liu L, Tong Q, Liu S, Cui J, Zhang Q, Sun W, Yang S. ZEB1 Upregulates VEGF Expression and Stimulates Angiogenesis in Breast Cancer. *PloS one*. 2016;11(2):e0148774.
241. Mironchik Y, Winnard PT, Jr, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwalla ZM, Van Diest P. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res*. 2005;65(23):10801–10809.
242. Vesuna F, Winnard P, Jr, Glackin C, Raman V. Twist overexpression promotes chromosomal instability in the breast cancer cell line MCF-7. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;167(2):189–191.
243. Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Domek J, Kato Y, van der Groep P, Artemov D, Kowalski J, Carraway H, van Diest P, Raman V. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by downregulating estrogen receptor- α . *Oncogene*. 2011;31(27):3223-3234.
244. Qiao W, Jia Z, Liu H, Liu Q, Zhang T, Guo W, Li P, Deng M, Li S. Prognostic and clinicopathological value of Twist expression in breast cancer: A meta-analysis. *PloS one*. 2017;12(10):e0186191.
245. Vesuna F, Bergman Y, Raman V. Genomic pathways modulated by Twist in breast cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):52.
246. De Craene B, Berx G. Snail in the frame of malignant tumor recurrence. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):105.

247. Kajita M, McClinic KN, Wade PA. Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Mol Cell Biol.* 2004;24(17):7559-7566.
248. Vega S, Morales AV, Ocaña OH, Valdés F, Fabregat I, Nieto MA. Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes Dev.* 2004;18(10):1131-1143.
249. Gumireddy K, Li A, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Showe LC, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Huang Q. KLF17 is a negative regulator of epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Nature cell biology.* 2009;11(11):1297-1304.
250. Cesi V, Casciati A, Sesti F, Tanno B, Calabretta B, Raschellà G. TGF β -induced c-Myb affects the expression of EMT-associated genes and promotes invasion of ER+ breast cancer cells. *Cell Cycle.* 2011;10(23):4149-4161.
251. Knopfová L, Biglieri E, Volodko N, Masařík M, Hermanová M, Glaus Garzón JF, Dúcka M, Kučírková T, Souček K, Šmarda J, Beneš P, Borsig L. Transcription factor c-Myb inhibits breast cancer lung metastasis by suppression of tumor cell seeding. *Oncogene.* 2018;37(8):1020-1030.
252. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-172.
253. Flower DR. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482(1-2):327-336.
254. Song M, Ramaswamy S, Ramachandran S, Flowers LC, Horowitz IR, Rock JA, et al. Angiogenic role for glycodefin in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9265–9270.
255. Hull-Thompson J, Muffat J, Sanchez D, Walker DW, Benzer S, Ganfornina MD, et al. Control of metabolic homeostasis by stress signaling is mediated by the lipocalin NLaz. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000460.
256. Yan L, Borregaard N, Kjeldsen L, Moses MA. The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9

- and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J Biol Chem*. 2001;276:37258–37265.
257. Pitteri SJ, Faca VM, Kelly-Spratt KS, Kasarda AE, Wang H, Zhang Q, et al. Plasma proteome profiling of a mouse model of breast cancer identifies a set of up-regulated proteins in common with human breast cancer cells. *J Proteome Res*. 2008;7:1481–1489.
258. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maass N, Friedl A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;108:389–397.
259. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3913–3918.
260. Yang J, Moses MA. Lipocalin 2: a multifaceted modulator of human cancer. *Cell Cycle*. 2009;8(15):2347-2352.
261. Lo HW, Hsu SC, Xia W, Cao X, Shih JY, Wei Y, Abbruzzese JL, Hortobagyi GN, Hung MC. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research*. 2007;67(19): 9066-9076.
262. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-867.
263. Katsura A, Tamura Y, Hokari S, Harada M, Morikawa, M, Sakurai T, Takahashi K, Mizutani A, Nishida J, Yokoyama Y, Morishita Y, Murakami T, Ehata S, Miyazono K, Koinuma D. ZEB1-regulated inflammatory phenotype in breast cancer cells. *Molecular oncology*. 2017;11(9):1241-1262.
264. Li H, Qiu Z, Li F, Wang C. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett*. 2017;14(5):5865-5870.
265. Mehner C, Hockla A, Miller E, Ran S, Radisky DC, Radisky ES. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and

- metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*. 2014;5(9):2736-2749.
266. Yan S, Xue H, Zhang P, Han X, Guo X, Yuan G, Deng L, Li G. MMP inhibitor Ilomastat induced amoeboid-like motility via activation of the Rho signaling pathway in glioblastoma cells. *Tumour Biol*. 2016; [Epub ahead of print]
267. Rege TA, Fears CY, Gladson CL. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol*. 2005;7(2):106-121.
268. Tremblay P, Beaudet M, Tremblay E, Rueda N, Thomas T, Vallières L. Matrix metalloproteinase 2 attenuates brain tumour growth, while promoting macrophage recruitment and vascular repair. *J Pathol*. 2011;224(2):222-233.
269. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ. A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2002;62(15):4478-4483.
270. Janyasupab M, Lee YH, Zhang Y, Liu CW, Cai J, Popa A, Samia AC, Wang KW, Xu J, Hu CC, Wendt MK, Schiemann BJ, Thompson CL, Yen Y, Schiemann WP, Liu C. Detection of Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2), a Biomarker of Metastasis from Breast Cancers Using Human Blood Samples. *Recent Pat Biomark*. 2015;5(2):93-100.
271. Rege TA, Fears CY, Gladson CL. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol*. 2005;7(2):106-121.
272. Martin MD, Matrisian LM. The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(3-4):717-724.
273. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2001;70:1-32.
274. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhöfer N, Kong C, Le QT, Chi JT, Jeffrey SS, Giaccia AJ. Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Research*. 2006;66(21):10238-10241.

275. De Donato M, Petrillo M, Martinelli E, Filippetti F, Zannoni GF, Scambia G, Gallo D. Uncovering the role of nuclear Lysyl oxidase (LOX) in advanced high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2017;146(1):170-178.
276. Stewart GD, Gray K, Pennington CJ, Edwards DR, Riddick AC, Ross JA, Habib FK. Analysis of hypoxia-associated gene expression in prostate cancer: lysyl oxidase and glucose transporter-1 expression correlate with Gleason score. *Oncol Rep.* 2008;20(6):1561-1567.
277. Miller BW, Morton JP, Pinese M, Saturno G, Jamieson NB, McGhee E, Timpson P, Leach J, McGarry L, Shanks E, Bailey P, Chang D, Oien K, Karim S, Au A, Steele C, Carter CR, McKay C, Anderson K, Evans TR, Marais R, Springer C, Biankin A, Erler JT, Sansom OJ. Targeting the LOX/hypoxia axis reverses many of the features that make pancreatic cancer deadly: inhibition of LOX abrogates metastasis and enhances drug efficacy. *EMBO molecular medicine* 2015;7(8):1063-1076.
278. Baker AM, Cox TR, Bird D, Lang G, Murray GI, Sun XF, Southall SM, Wilson JR, Erler JT. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(5):407-424.
279. Kasashima H, Yashiro M, Kinoshita H, Fukuoka T, Morisaki T, Masuda G, Sakurai K, Kubo N, Ohira M, Hirakawa K. Lysyl oxidase is associated with the epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells in hypoxia. *Gastric Cancer.* 2016;19(2):431-442.
280. Wilgus ML, Borczuk AC, Stoopler M, Ginsburg M, Gorenstein L, Sonett JR, Powell CA. Lysyl oxidase: a lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival. *Cancer.* 2011;117(10):2186-2191.
281. Chang J, Lucas MC, Leonte LE, Garcia-Montolio M, Singh LB, Findlay AD, Deodhar M, Foot JS, Jarolimek W, Timpson P, Erler JT, Cox TR. Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer. *Oncotarget.* 2017;8(16):26066-26078.

282. Ribeiro AL, Kaid C, Silva PBG, Cortez BA, Okamoto OK. Inhibition of Lysyl Oxidases Impairs Migration and Angiogenic Properties of Tumor-Associated Pericytes. *Stem Cells Int.* 2017;2017:4972078.
283. Wei L, Song XR, Sun JJ, Wang XW, Xie L, Lv LY. Lysyl oxidase may play a critical role in hypoxia-induced NSCLC cells invasion and migration. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals.* 2012;27(10):672-677.
284. Chen LC, Tu SH, Huang CS, Chen CS, Ho CT, Lin HW, Lee CH, Chang HW, Chang CH, Wu CH, Lee WS, Ho YS. Human breast cancer cell metastasis is attenuated by lysyl oxidase inhibitors through down-regulation of focal adhesion kinase and the paxillin-signaling pathway. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(3):989-1004.
285. Nilsson G, Kannius-Janson M. Forkhead Box F1 promotes breast cancer cell migration by upregulating lysyl oxidase and suppressing Smad2/3 signaling. *BMC Cancer.* 2016;16:142.
286. Tang H, Leung L, Saturno G, Viros A, Smith D, Di Leva G, Morrison E, Niculescu-Duvaz D, Lopes F, Johnson L, Dhomen N, Springer C, Marais R. Lysyl oxidase drives tumour progression by trapping EGF receptors at the cell surface. *Nature communications.* 2017;8:14909.
287. Baker AM, Bird D, Welti JC, Gourlaouen M, Lang G, Murray GI, Reynolds AR, Cox TR, Erler JT. Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer research.* 2012;73(2):583-594.
288. Osawa T, Ohga N, Akiyama K, Hida Y, Kitayama K, Kawamoto T, Yamamoto K, Maishi N, Kondoh M, Onodera Y, Fujie M, Shinohara N, Nonomura K, Shindoh M, Hida K. Lysyl oxidase secreted by tumour endothelial cells promotes angiogenesis and metastasis. *British journal of cancer.* 2013;109(8):2237-2247.
289. Hong X, Yu JJ. Silencing of lysyl oxidase-like 2 inhibits the migration, invasion and epithelial-to-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells through the Src/FAK signaling pathway. *Int J Oncol.* 2019; [Epub ahead of print]

290. Zheng Y, Wang X, Wang H, Yan W, Zhang Q, Chang X. Expression of the lysyl oxidase propeptide in hepatocellular carcinoma and its clinical relevance. *Oncol Rep.* 2014;31:1669–1676.
291. Bais MV, Ozdener GB, Sonenshein GE, Trackman PC. Effects of tumor-suppressor lysyl oxidase propeptide on prostate cancer xenograft growth and its direct interactions with DNA repair pathways. *Oncogene.* 2015;34:1928–1937.
292. Ozdener GB, Bais MV, Trackman PC. Determination of cell uptake pathways for tumor inhibitor lysyl oxidase propeptide. *Mol Oncol.* 2016;10:1–23.
293. Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, Kaminishi M, Sugimura T, Ushijima T. Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.* 2004;64:6410–6415.
294. Wang TH, Hsia SM, Shieh TM. Lysyl Oxidase and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016;18(1):62.
295. Sato S, Zhao Y, Imai M, Simister PC, Feller SM, Trackman PC, Kirsch KH, Sonenshein GE. Inhibition of CIN85-mediated invasion by a novel SH3 domain binding motif in the lysyl oxidase propeptide. *PloS one.* 2013;8(10):e77288.
296. Ciurea ME, Georgescu AM, Purcaru SO, Artene SA, Emami GH, Boldeanu MV, Tache DE, Dricu A. Cancer stem cells: biological functions and therapeutically targeting. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(5):8169-8185.
297. Luo M, Brooke M, Wicha MS. Epithelial-Mesenchymal Plasticity of Breast Cancer Stem Cells: Implications for Metastasis and Therapeutic Resistance. *Current pharmaceutical design.* 2015;21(10):1301-1310.
298. Roato I, Ferracini R. Cancer Stem Cells, Bone and Tumor Microenvironment: Key Players in Bone Metastases. *Cancers.* 2018;10(2):56.
299. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Reports.* 2014;15(3):244-253.
300. Horak IR, Pasichnyk GV, Gerashchenko DS, Knopfova L, Borsig L, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates manifestation of cancer stem cells (CSCs)

- features in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2018;12:101-109.
301. Yu F, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, Ai W. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene*. 2011;30(18):2161—2172.
302. Kim R-J, Nam J-S. OCT4 expression enhances features of cancer stem cells in a mouse model of breast cancer. *Lab. Anim. Res.* 2011;27(2):147—152.
303. Lu X, Mazur SJ, Lin T, Appella E, Xu Y. The pluripotency factor Nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2014;33(20):2655—2664.
304. Jang MH, Kang HJ, Jang KS, Paik SS, Kim WS. Clinicopathological analysis of CD44 and CD24 expression in invasive breast cancer. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2728-2733.
305. Li W, Ma H, Zhang J, Zhu L, Wang C, Yang Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci Rep.* 2017;7:13856.
306. Pasichnyk GV, Povorozniuk OO, Horak IR, Gerashchenko DS, Ponomarenko OV, Samoylenko AA, Byts NV, Drobot LB. Overexpression of adaptor protein Rukl/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance. Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. 2013;12:149-156.
307. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I, Ochiya T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2574.
308. Horak I, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates chemoresistance of 4T1 breast cancer cells. *Ukr Biochem J.* 2018;90(3):94-100.
309. Niero EL, Rocha-Sales B, Lauand C, Cortez BA, de Souza MM, Rezende-Teixeira P, Urabayashi MS, Martens AA, Neves JH, Machado-Santelli GM. The multiple facets of drug resistance: one history, different approaches. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:37.

310. McCubrey JA, Abrams SL, Fitzgerald TL, Cocco L, Martelli AM, Montalto G, Cervello M, Scalisi A, Candido S, Libra M, Steelman LS. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv Biol Regul.* 2015;57:75-101.
311. AbuHammad S, Zihlif M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics.* 2013;101(4):213-220.
312. Aissouni Y, Zapart G, Iovanna JL, Dikic I, Soubeyran P. CIN85 regulates the ability of MEKK4 to activate the p38 MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(2):808-14.
313. Заявка на корисну модель № u201806310. МПК (2018.01): C12Q 1/6886, C12N 5/10, C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/16. Застосування стабільних субліній пухлинних клітин як моделі для тестування протипухлинних препаратів, скерованих на знищення ракових стовбурових клітин / Дробот Л.Б., Комісаренко С.В., Пасічник Г.В., Горак І.Р., Геращенко Д.С., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України – заявл. 06.06.2018 р.; Висновок про відповідність від 05.10.2018 р. № 25674/ЗУ/18.
314. Ma Y, Ye F, Xie X, Zhou C, Lu W. Significance of PTPRZ1 and CIN85 expression in cervical carcinoma. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;284(3):699-704.
315. Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol.* 2017;11(7):755-769.
316. Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31(3-4):469-478.
317. Falato C, Lorent J, Tani E, Karlsson E, Wright PK, Bergh J, Foukakis T. Ki67 measured in metastatic tissue and prognosis in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;147(2):407-414.

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ**

1. **I. Horak**, L. Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates chemoresistance of 4T1 breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.* 2018; 90 (3): 94-100.
2. **I. R. Horak**, G. V. Pasichnyk, D. S. Gerashchenko, L. Knopfova, L. Borsig, L. B. Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates manifestation of cancer stem cells (CSCs) features in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2018; 12: 101-109.
3. **I. Horak**, L. Drobot, L. Borsig, L. Knopfova. Overexpression of adaptor protein Ruk/CIN85 in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells is followed by increased migration rate and invasion potential. *Biopolymers and Cell.* 2018; 34 (4): 284-291.
4. A. V. Bazalii, **I. R. Horak**, G. V. Pasichnyk, S. V. Komisarenko, L. B. Drobot. Transcriptional regulation of NOX genes expression in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells is modulated by adaptor protein Ruk/CIN85. *Ukr. Biochem. J.* 2016; 88 (1): 119-125.
5. G.V. Pasichnyk, O. O. Povorozniuk, **I.R. Horak**, D. S. Gerashchenko, O.V. Ponomarenko, A.A. Samoylenko, N.V. Byts, L.B. Drobot. Overexpression of adaptor protein Rukl/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2013; 12: 149-156.
6. Заявка на корисну модель № u201806310. МПК (2018.01): C12Q 1/6886, C12N 5/10, C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/16. Застосування стабільних субліній пухлинних клітин як моделі для тестування протипухлинних препаратів, скерованих на знищення ракових стовбурових клітин / Дробот Л.Б., Комісаренко С.В., Пасічник Г.В., **Горак І.Р.**, Герашченко Д.С., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН

України – заявл. 06.06.2018 р.; Висновок про відповідність від 05.10.2018 р. № 25674/ЗУ/18.

7. **Горак І.**, Пасічник Г., Поворознюк О., Самойленко А., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 супроводжується активацією сигнальних шляхів, залежних від РІЗ-кінази та транскрипційного фактора NF-κB, у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7. // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014», Київ, 29-30 травня 2014. – Київ, 2014. – С. 29.
8. Поворознюк О., Пасічник Г., **Горак І.**, Биць Н., Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 супроводжується посиленням прояву властивостей ракових стовбурових клітин // Конференція-конкурс молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2014», Київ, 29-30 травня 2014. – Київ, 2014. – С. 36.
9. Pasichnyk G., Povorozniuk O., **Horak I.**, Gerashchenko D., Samoilenko A., Drobot L. Overexpression of adaptor ptotein Rukl/CIN85 in MCF-7 cells is accompanied by increased resistance to doxorubicin // International Symposium on Cell Biology jointly with 4-th Ukrainian Congress for Cell Biology, Uzhhorod, 17-20 September 2014. – Uzhhorod, 2014. – P. 73.
10. Pasichnyk G., Povorozniuk O., **Horak I.**, Geraschenko G., Petukhov D., Samoilenko A., Byts N., McCubrey J., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 overexpression results in the development of stemness characteristics of MCF-7 breast adenocarcinoma cells // FEBS J. – 2014. – Vol. 281, Suppl. 1. – P. 432.
11. **Horak I.**, Petukhov D., Pasichnyk G., Gerashchenko D., Shabas N., , Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Ruk/CIN85 overexpression in mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells is accompanied by altered migration and invasion

- // Materials of the Conference for Young Scientists 2015 – p. 161 (Kyiv, Ukraine, September 21-25, 2015).
12. **Horak Iryna**, Pasichnyk Ganna, Gerashchenko Denys, Petukhov Dmytro, Shabas Nadia, Knopfova Lucia, Borsig Lubor, Drobot Liudmyla. Adaptor protein Ruk/CIN85 overexpression leads to increased adhesion, migration and invasion of mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells // Materials of the International conference “Advances in cell biology and biotechnology” – 2015 – p. 81 (Lviv, Ukraine, October 11-13, 2015).
 13. **Horak I.**, Pasichnyk G., Gerashchenko D., Petukhov D., Shabas N., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Functional properties of mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells depend on adaptor protein Ruk/CIN85 expression level // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87, №4. – Р. Матеріали конференції-конкурсу молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня, 2015).
 14. Стародубцева А., Пасічник Г., **Горак І.**, Дробот Л. Надекспресія адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у клітинах аденокарциноми молочної залози людини лінії MCF-7 асоційована з підвищенням їх резистентності до доксорубіцину // XIII Міжнародна наукова конференція молодих вчених. Шевченківська весна: Біологія-2015, Київ, 1-3 квітня 2015. – Київ, 2015. – С. 88.
 15. **Horak I. R.** Adaptor protein Ruk/CIN85 induces EMT in mouse 4T1 breast adenocarcinoma cells // Матеріали конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016» - с. 14 (Київ, Україна, 26-27 травня 2016).
 16. **Horak I.**, Shytikov D., Petukhov D., Pasichnyk G., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 promotes lung mttastasis of 4T1 murine breast adenocarcinoma cells // Materials of the International Scientific Conference “Integrated Clinical and Pathogenetic Approaches in Diagnosis and Therapy of Cancer” (Kyiv, Ukraine, June 13-15, 2016).

17. **Horak I.**, Pasichnyk G., Shabas N., Gerashchenko D., Petukhov D., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects breast cancer cell motility and invasion in vitro // Materials of X Parnas Conference. Young Scientists Forum “Molecules in the Living Cell and Innovative Medicine” – p. 47 (Wroclaw, Poland, July 10-12 2016).
18. **Horak Iryna**, Knopfova Lucia, Borsig Lubor, Pasichnyk Ganna, Drobot Liudmyla. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces EMT, migration and invasiveness of mice breast adenocarcinoma 4T1 cells // FEBS J., Vol. 283, Issue Supplement S1, P. 431. Special Issue: 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life (Ephesus/Kuşadasi, Turkey, September 3-8, 2016).
19. **I. R. Horak**, G. V. Pasichnyk, D. S. Gerashchenko, L. Knopfova, L. Borsig, L. B. Drobot. Cellular plasticity as a driving force in cancer progression: the regulatory role of adaptor protein Ruk/CIN85. Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (3): 102-103.
20. **Iryna Horak**, Dmytro Shytikov, Denys Geraschenko, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. The adaptor protein Ruk/CIN85 paradoxically enhances EMT of triple negative mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells // Materials of International VACTRAIN/ 3rd Swedish-Ukrainian conference on cancer diseases, Stockholm, Sweden, January 16-17, 2017.
21. **Iryna Horak**, Dmytro Shytikov, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 induces genomic reprogramming in breast cancer cells and thereby increases their malignancy // Joint Meeting of the 25-th Annual Conference “Modern Aspects of Biochemistry and Biotechnology” and 2-nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine, June 6-9, 2017. - Ukr. Biochim. J. – 2017. – Vol. 89. – No 3. – P. 81.

22. **Horak I.**, Shytikov D., Knopfova L., Borsig L., Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a critical switch of EMT/MET programs in 4T1 cells // Materials of FEBS Advanced Lecture Course on Oncometabolism, Figueira da Foz, Portugal, June 18-24, 2017, - P.68.
23. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Dmytro Shytikov, Denys Geraschenko, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 increases breast cancer cells malignancy via promoting EMT// Materials of Minisymposium with international participation “New trends in cancer research and innovative tumor vaccines”, Kyiv, Ukraine, May 11, 2017.
24. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Denys Gerashchenko, Nadia Shabas, Dmytro Shytikov, Dmytro Petukhov, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates malignancy of breast cancer cells // Materials of 14-th Horizons in Molecular Biology, Goettingen, Germany, September 11-14, 2017, - P. 77.
25. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 enhances the features of CSCs in breast cancer cells // International Scientific Conference “Normal and Cancer Stem Cells: Discovery, Diagnosis and Therapy”, Kyiv, Ukraine, October 5-6, 2017. – Experimental Oncology – 2017, Vol. 39, P. 242.
26. **Iryna Horak**, Tetiana Skaterna, Denis Geraschenko, Artem Tykhomyrov, Olga Khudiakova, Liudmyla Drobot. Knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85 in 4T1 and LLC adenocarcinoma cells results in increased expression levels and activities of MMP-2 and MMP-9 associated with elevated production of angiostatins and suppression of invasive potential. Exp. Oncol. 2018; 40: 16.
27. **Iryna Horak**, Ganna Pasichnyk, Denys Gerashchenko, Dmytro Shytikov, Tetiana Skaterna, Olga Khudiakova, Lucia Knopfova, Lubor Borsig, Liudmyla Drobot. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a key regulator of epithelial-

- mesenchymal plasticity of breast cancer cells. Ukr. Biochem. J. 2018; 90 (Special Issue): 17.
28. **I. Horak**, T. Skaterna, O. Khudiakova, D. Gerashchenko, D. Shytikov, D. Petukhov, A. Tykhomyrov, L. Kapustianenko, T. Grynenko, L. Drobot. Knockdown of adaptor protein Ruk/CIN85 in tumor cells results in inhibition of their invasiveness and metastatic potential mediated by angiostatin production. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.
29. М. Кириченко, **I. Горак**, Л. Дробот. Адаптерний протеїн Ruk/CIN85 модулює експресію ключових маркерів епітелійно-мезенхімного переходу у клітинах раку молочної залози миші лінії 4Т1. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.
30. М. Кір'якулова, А. Живоложний, **I. Горак**, А. Самойленко, Л. Дробот. Ізолювання та характеристика екзосом, що продукуються пухлинними клітинами з різним вмістом адаптерного протеїну Ruk/CIN85. // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Фундаментальна медицина: інтегральні підходи до терапії хворих з онкопатологією», Київ, Україна, 4-5 лютого 2019.